Aus dem Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamt Stuttgart
Vorstand: Ob. -Reg. -Vet. -Rat Dr. O. Scheu

DIE DIAGNOSE DER TOLLWUT UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG SEROLOGISCHER METHODEN UND VERGLEICHENDE VERSUCHE MIT DER KOMPLEMENTBINDUNGSREAKTION UND DER PRÄZIPITATION IM AGARMILIEU

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Manfred Peter
Tierarzt aus Neuruppin

Berlin 1961

Journal Nr. 338

Druck:

Ernst - Reuter - Gesellschaft
der Förderer und Freunde der Freien Universität e.V.

Dissertations - Druckstelle

Berlin-Dahlem, Garystr. 45, Tel.: 76 52 61, App. 868

Aus dem Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamt Stuttgart
Vorstand: Ob. -Reg. -Vet. -Rat Dr. O. Scheu

DIE DIAGNOSE DER TOLLWUT UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG SEROLOGISCHER METHODEN UND VERGLEICHENDE VERSUCHE MIT DER KOMPLEMENTBINDUNGSREAKTION UND DER PRÄZIPITATION IM AGARMILIEU

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Manfred Peter
Tierarzt aus Neuruppin

Berlin 1961

Journal Nr. 338

Gedruckt mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen
Fakultät der Freien Universität Berlin

Dekan	:	Prof. Dr. L. Felix Müller
Referent	:	Prof. Dr. H. Hartwigk
Korreferent:		Prof. Dr. W. Renk

Tag der mündlichen Prüfung: 21. VII. 1961

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Inhaltsverzeichnis

Einleitung

Literatur

A. Die klinischen Erscheinungen

B. I. Die pathologisch-anatomischen Veränderungen

II. Die pathologisch-histologischen Veränderungen

C. I. Die Züchtung des Tollwutvirus in der Gewebekultur und in Hühnerembryonen

II. Der Tierversuch

III. Der serologische Nachweis des Erregers oder von Erregersubstanzen

1. Die Diagnose der Tollwut mit Hilfe der Haemagglutination

2. Färbung des Tollwutantigens mit fluorescierenden Antikörpern

3. Die Diagnose der Tollwut durch die Komplementbindungsreaktion

4. Die Diagnose der Tollwut durch die Präzipitationsreaktion

D. Der Nachweis spezifischer Antikörper als Folge einer natürlichen Tollwutinfektion

Eigene Versuche

A. Vorversuche zur Komplementbindungsreaktion

B. Vorversuche zur Präzipitation im Agarmilieu

Hauptversuche

I. Versuchsreihe

1. Ziel und Material

2. Methodik

3. Versuchsergebnisse

4. a) Besprechung der Ergebnisse in der Komplementbindungsreaktion

b) Besprechung der Ergebnisse in der Präzipitation im Agarmilieu

II. Versuchsreihe
1. Ziel und Material
2. Methodik
3. Versuchsergebnisse
4. Besprechung der Ergebnisse

Schlußbetrachtung

Zusammenfassung

Literaturverzeichnis

Einleitung

Die Tollwut ist eine der am längsten bekannten Zoonosen. Nach SELLERS (1959) findet sich der vielleicht älteste Hinweis im praemosaischen Eschnunna Codex, der dem besser bekannten Hamurabi Codex des alten Babylon im 23. Jahrhundert v. Chr. vorausging. Auch heute noch herrscht sie in vielen Teilen der Welt.

Nach dem zweiten Weltkrieg hat die Tollwut von Osten kommend sich in unaufhaltsamem Zuge in Deutschland ausgebreitet und im Jahre 1958 die Grenzen des Landes Baden-Württemberg überschritten. Für die mit der Feststellung der Tollwut betrauten tierärztlichen Institute und Untersuchungsämter erwuchs damit eine weitere verantwortungsvolle Aufgabe.

Bei der Tollwut mit ihrer Gefahr für den Menschen ist eine schnelle und sichere Diagnose unerläßlich. Neben der allgemein üblichen histologischen Untersuchung des Ammonshornes und dem Tierversuch werden verschiedentlich serologische Untersuchungsmethoden zum Nachweis einer Tollwutinfektion vorgeschlagen. Mir wurde die Aufgabe gestellt, die hierüber verfügbare Literatur zu sammeln und vergleichende Versuche zur Erprobung der Komplementbindungsreaktion (KBR) und der Präzipitation im Agar-Gel bei der Routine-Diagnose der Tollwut durchzuführen.

Die Tollwutdiagnostik

Als eine der Grundbedingungen für die Bekämpfung und Kontrolle einer Tollwutepidemie gilt die Sicherung der Diagnose (KAPLAN, 1954; PIRINGER, 1939).
Zur Feststellung einer Infektionskrankheit können herangezogen werden:

A. Die klinischen Erscheinungen

B. I. Die pathologisch-anatomischen Veränderungen
II. Die pathologisch-histologischen Veränderungen

C. Der Nachweis des Erregers oder von Erregersubstanzen

I. Durch Züchtung
II. Durch den Tierversuch
III. Durch serodiagnostische Methoden

D. Der Nachweis spezifischer Antikörper

A. Die klinischen Erscheinungen

Die klinischen Erscheinungen bei der Tollwut beschreiben eingehend STARR, SELLERS und SUNKERS (1952), SCHOOP (1953), SCHAAF, WEIDLICH und STURM (1956), HUTYRA, MAREK, MANNINGER und MOCSY (1959) und HEBEL (1960). In einer ganzen Reihe von Veröffentlichungen wird jedoch darauf hingewiesen, daß der Vorbericht für die Tollwutdiagnose nicht entscheidend sein kann (BALLA, 1911; FELDFORTH, 1955; GORSHUNOWA, 1958; SCHNELLE, 1961). Agressivität (HELMBOLDT und JUNGHERR, 1955), Beißsucht (AGUZZI, 1900; GUNDELACH, 1923; NÖRR, 1935), perverser Appetit und das Beißen in vorgehaltene Gegenstände (NÖRR, 1935; HELMDOLDT und JUNGHERR, 1955), Unterkieferlähmung und Speichelfluß (NÖRR, 1935; VÖHRINGER, 1955) können sich bei der nervösen Form der Staupe ausbilden. Über Staupefälle, die Tollwut vortäuschen, berichten auch BERGER (1911), sowie HABERMANN, HERMAN und WILLIAMS (1958). Folgende Krankheiten können sich ebenfalls hinter den Symptomen der Tollwut verbergen: Bleivergiftung beim Rind (ROEMMELE, 1954), Parasitismus (MONOD, 1900, SCHAAF, WEIDLICH und STURM, 1956, HABERMANN, HERMAN, und WILLIAMS, 1958), Gehirnabzesse (FANKHAUSER, 1955) und ansteckende Schweinelähmung (MICHALKA, 1942).

B. I. Die pathologisch-anatomischen Veränderungen

Die pathologisch-anatomischen Veränderungen können zu einer endgültigen Diagnose nicht herangezogen werden. Sehr oft ist der Sektionsbefund völlig negativ. Für das Vorliegen der Tollwut können folgende Obduktionsbefunde sprechen:

1. Frisch ausgebrochene Schneidezähne, Erosionen an den Lippen, am Zahnfleisch und an der Zunge. Unterkieferfrakturen (SCHAAF, WEIDLICH und STURM, 1956, HEBEL, 1960).

2. Wunden (Scheuerstellen am Kopf beim Reh, Selbstverstümmelung bei Karnivoren) und Narben (PAARMANN, 1955, SCHAAF, WEIDLICH und STURM, 1956).

3. Gastritis catarrhalis oder Gastritis haemorrhagića, Fremdkörper im Magen (AGUZZI, 1900, SCHLEGEL, 1926, TREFLINGER, 1949, HARMS und HOBIGK, 1953, SCHAAF, WEIDLICH und STURM, 1956 WILCOX, 1958, HUTYRA, MAREK, MANNINGER und MOCSY, (1959). Andere Befunde (parenchymatöse Degeneration der Leber, der Nieren und des Herzmuskels, subepicardiale Blutungen, akuter Katarrh im Bereiche der Luftwege, Hyperaemie und Oedem der Speicheldrüsen und des Gehirns, markige Schwellung der Darmlymphknoten) (HUTYRA, MAREK, MANNINGER und MOCSY, 1959, HEBEL, 1960) sind weniger charakteristisch und kommen bei der Tollwut auch selten vor.

II. Die pathologisch-histologischen Veränderungen

Die histologische Untersuchung des Zentralnervensystems ist eine der klassischen Methoden der Tollwutdiagnostik. Das Vorliegen einer disseminierten Polioencephalomyelitis non purulenta, von Ganglienzelldegeneration und Neuronophagie, Wucherung der Gliazellen mit Bildung knötchenartiger Herde (Wutknötchen nach Babes), einer lymphozytären und erythrozytären perivaskulären Infiltration unterstützt zwar die Diagnose (NIEBERLE und COHRS, 1954, PALLASKE, 1960, HEBEL, 1960) ausschlaggebend ist aber allein der Nachweis von Negri'schen Körperchen.

Der Nachweis der zum ersten Male von NEGRI (1903) beschriebenen Ganglienzell-Einschlußkörperchen gestattet eine rasche Tollwutdiagnose. Die Sicherheit des Tollwutnachweises mittels dieser Methode wird im Schrifttum wie folgt angegeben:

ERNST, 1926	96 - 99 %
LEACH, 1938	88 %
GILDEMEISTER, HAAGEN und WALDMANN, 1939	94 - 95 %
STEELE und THIERKEL, 1949	88 - 90 %
ADUTZKEWITSCH, 1951	ca 75 %
LAPI, DAVIS und WAYNE, 1952	85 - 90 %
SCHULZE 1953	80 %
WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO), 1954	85 – 90 %
NIEBERLE und COHRS, 1954	ca 85 %
FLIR, 1953	ca 70 %
PAARMANN, 1955	62 %
SCHAAF, WEIDLICH und STURM, 1956	92,4 %
BULLING, 1957	85 - 95 %
GOLDWASSER und KISSLING, 1958	74 - 90 %
LINSERT, TEMPLIN und WOLTER, 1959	75,3 %
BINDRICH, KUWERT und BECKER, 1959	60 - 80 %
PALLASKE, 1960	ca 85 %

Die Begründung für das Versagen des Negri-Körperchen-Nachweises in einem gewissen Prozentsatz von Tollwutfällen ist unterschiedlicher Art und läßt sich in folgenden Punkten zusammenfassen:

1. Die Negri'schen Körperchen entwickeln sich erst im Spätstadium der Tollwut (BROSCH, 1926, COLLIER, 1940, MOHR und ENIGK, 1952, ANDO, ISHI, IRIZAWA, SHIMATA, KATO und MURAHAMI, 1953, OHDER, 1954, THOMPSON, 1957, FRAS und GRMOVSEK, 1958). Von anderer Seite wird jedoch die Auffassung vertreten, daß die Zahl und die Größe der Negri'schen Körperchen nicht in Beziehung zur Inkubationszeit und zur Dauer der Krankheit stehen (REPETTO, 1903, MOORE, 1909, GERLACH, 1923, LEVADITI und SCHOEN, 1936).

2. Es gibt Tollwut-Virusstämme, die nicht in der Lage sind Negri'sche Körperchen zu bilden (LEVADITI und SCHOEN, 1936, ANDO, ISHI, IRIZAWA, SHIMATA, KATO, und MURAHAMI, 1953, THOMPSON, 1957). Andererseits können manche Tierarten, z. B. Tauben, zwar Virusträger sein, im Gehirn aber keine Negrikörperchen ausbilden (NIKOLITSCH, GILDEMEISTER und JELESITSCH, 1959).

3. Junge Tiere bilden keine Negri'schen Körperchen (NOUVY und CHEVRIER, 1958).

4. Schnell aufeinander folgende Viruspassagen bei einer Tierart führen zum Verlust der Fähigkeit Negri'sche Körperchen zu bilden (SCHIFFMANN, 1906, LAMB und KENDRICK, 1910). Dieser Ansicht stehen Versuche gegenüber, bei denen selbst mit dem Virus fixe-Stamm "Louis Pasteur" durch Zusatz von Speichel gesunder Hunde oder Hyaluronidase Negri'sche Körperchen erzeugt werden konnten (BEQUIGNON, GUICHARD und VIALAT, 1953).

5. Die Negri'schen Körperchen sind im stark zersetzten Gehirn nicht mehr nachweisbar (NIEBERLE und COHRS, 1954).

6. Das individuelle Reaktionsvermögen der erkrankten Tiere beeinflußt die Fähigkeit des Virus, Negri'sche Körperchen zu bilden.

Der Nachweis der Negri'schen Körperchen gelingt im allgemeinen nach Färbung von Gehirnschnitt- und Gehirnabklatsch- oder -quetschpräparaten des Ammonshornes (NAGLE, 1937, SCHLEIFSTEIN, 1937, SCHAAF, 1941, BARTEL, 1947, RIVERS, 1948 STEELE und THIERKEL, 1949, RHODES und RHOYEN, 1949, ADUTZKEWITSCH, 1951, MOHR und ENICK, 1952, BRANDENBURG, 1952, FLIR, 1953, GRIEM, 1953, HARMS und HOBIGK, 1953, SCHRÖTER, 1954, LEPINE, 1954, KAPLAN, 1954, SCHELLNER, HÄRTL und OSTHOFF, 1954, KORNILOWA und KURANOW, 1955, UHLMANN und FALKE, 1957, OHDER, 1958, PITSCHKE, 1958 BINDRICH, KUWERT und BECKER, 1959, LINDNER, 1960, MATTHIAS und LINDNER, 1960, PALLASKE, 1960). Einige Arbeiten weisen darauf hin, daß Negri'sche Körperchen auch in anderen Gehirnteilen zu finden sind (ADUTZKEWITSCH, 1951, OHDER, 1959).

Die Arbeit von MANUELIN (1935), der Negri'sche Körperchen bei tollwutinfizierten Tieren in den nervösen Zellen der Zunge und der Mundschleimhaut nachgewiesen hat, sowie von LEVADITI und SCHOEN (1936), die die Eischlußkörperchen bei künstlich infizierten Kaninchen in den Hornhautepithelien des Auges finden, können als Versuche einer Vervollkommnung des histologischen Nachweises der Tollwut gedeutet werden.

Mit dem Auftreten Negrikörperchen-ähnlicher Gebilde bei anderen Erkrankungen und sogar bei gesunden Tieren muß gerechnet werden (BROSCH, 1926, WEILAND, 1935, EMANUILOFF, 1941, SJOLTE, 1947, SZLACHTA und HABEL, 1953, PAARMANN, 1955, FLIR, 1953, SCHAAF, WEIDLICH und STURM, 1956, KANTOROWIC, 1956, HEBEL, 1960). FLIR (1953) empfiehlt daher, bei dem zur Untersuchung eingesanten Material einen strengeren Maßstab bei der Beurteilung verdächtiger Gebilde anzulegen als bei der Versuchsmaus.

Weitere Möglichkeiten der histologischen Tollwut-Diagnose

Auf der Suche nach einer Verbesserung der histologischen Tollwutdiagnose zeigen einzelne Arbeiten eigene Wege auf. HERZOG (1942) findet im Ganglion nodosum des Vagus Zellveränderungen, die bei Tollwut immer vorhanden sein sollen, unabhängig von der Zeit der Tötung. Ähnliches berichtet HINTON (1952) über das Ganglion Gasseri.

In eine ganz andere Richtung gehen die Untersuchungen von COLES (1937) und VERARAGHAVAN (1946). Sie finden im Gehirn tollwutkranker Tiere regelmäßig parasitenähnliche Gebilde und behaupten von dieser Methode des Tollwutnachweises, daß sie schnell und zuverlässig sei.

C. Der Nachweis des Erregers oder von Erregersubstanden

I. Die Züchtung des Tollwutvirus in der Gewebekultur und in Hühnerembryonen

Für die praktische Diagnose der Tollwut kommt der Virusnachweis über das bebrütete Hühnerei (DAWSON, 1939, RABIES, 1949, BULLING, 1955, YOSHINO, KUMA, KONDO, KITAOKA, 1956) nicht in Frage; es gelingt nicht, das Straßenvirus ohne weiteres an Hühnerembryonen zu adaptieren.

In der Hamsternieren-Zellkultur gelingt es KISSLING (1958) in einem von drei Versuchen, das Straßenvirus anzuzüchten. Allerdings lassen sich in diesem Fall genau wie beim Virus fixe zytopathogene Veränderungen nicht nachweisen. LEVADITI und SCHOEN (1936) berichten über eine selektive Affinität des Straßenvirus für die Zellen des Pearce'schen Karzinoms. Dort vermehrt es sich und verursacht die Bildung von Negri'schen Körperchen. Die Vermehrung des Straßenvirus der Tollwut im explantierten Ammonshorn und in Teilen des eigentlichen Cerebrums von i. c. infizierten Kaninchen weisen AKSEL

und AYKAN (1957) nach. Obwohl die Gewebekultur degeneriert und der Nekrose verfällt, nimmt die Zahl der Negri'schen Körperchen in den ersten Tagen nach der Explantation zu.

Das Expert Commitee on Rabies der W H O (1957) ist der Meinung, daß die Bemühungen, eine Gewebekultur zur Züchtung des Tollwutvirus zu finden, fortgesetzt werden sollten.

Über die Züchtung des Rabiesvirus in einem bei der Maus übertragbaren Astrozytom berichten PEARSON, ATANASIU und LEPINE (1958). Dabei kommt es zur Reproduktion des Tollwutvirus sowohl in dem infizierten 5 - 10 Gramm schweren Tumor, als auch im Zentralnervensystem und die Tiere sterben 14 Tage nach der Inokulation an Tollwut.

II. Der Tierversuch

Als sicherster Weg der Tollwutdiagnose gilt der Tierversuch. Er hat nach FERMI (1950) eine Sicherheit bis zu 100 %. Nach Angaben von GRIEM (1953) sterben 75,6 % der infizierten Mäuse an der Tollwut. LEACH (1938) gibt die Sicherheit des Mäuse-Tierversuches mit 88 % an, d. h. sie entspricht etwa derjenigen des pathologisch-histologischen Tollwutnachweises.

Der größte Nachteil des Tierversuches liegt in seiner langen Dauer. ERCEGOVAC und TURUBATOVIC (1954) versuchen ihn durch das Töten einzelner Versuchstiere ab 6. Tag post infektionem mit anschließender histologischer Gehirnuntersuchung zu beschleunigen.

Als Ursache von Fehlergebnissen des Tierversuches findet man im Schrifttum folgende Begründungen:

1. Inaktivierung oder starke Virulenzabschwächung des Virus bei ungünstiger Lagerung des Gehirnmaterials (SCHAAF, 1941, BRANDENBURG, 1952, PITSCHKE, 1958).
2. Autosterilisation des Gehirns bei langer Krankheitsdauer (RIVERS, 1948, GRIEM, 1953, NIKOLITSCH, 1957, PITSCHKE, 1958).
3. Ein atypisches, wenig virulentes Virus (SCHWEINBURG, 1932, SCHAAF, 1941, FERMI, 1950)oder das Überwiegen inaktiver Virusteilchen (Interferenzphaenomen nach KOPROWSKI) (PITSCHKE, 1958) oder eine zu kleine Impfdosis (GILDEMEISTER, HAAGEN und WALDMANN, 1939) die oft abhängig ist vom Entnahmeort des Gehirnmaterials (BRANDENBURG, 1952) und von der Art der Behandlung des Gewebes (BULLING, 1957). RIVERS, (1948) RHODES und ROOYEN (1949), BRANDENBURG (1952), KAPLAN (1954), PITSCHKE (1958) und SVET-MOLDAWSKAJA (1958) empfehlen daher als Ausgangsmaterial zur Bereitung der Impfsuspension verschiedene Gehirnteile und auch Speicheldrüse zu verwenden.
4. Die unterschiedliche Widerstandsfähigkeit der Versuchstiere gegenüber der Tollwutinfektion (GILDEMEISTER, HAAGEN und WALDMANN, 1939, BRANDENBURG, 1952).

5. Interkurrente Infektionen der Versuchstiere und Aktivierung latenter Infektionen.

Das Versuchstier der Wahl ist die Maus (LEACH, 1938, REMLINGER und BAILLY, 1940, SCHAAF, 1941, DUFFY, WOLLY und NOTLING, 1947, RIVERS, 1948, RHODES und ROOYEN, 1949, WHO, 1950, MOHR und ENIGK, 1952, BRANDENBURG, 1952, SCHULZE, 1953, GRIEM, 1953, ATTILLI, 1956, PITSCHKE, 1958, OHDER, 1958). Um von vornherein den Tierversuch zu spezifizieren, wird von vielen Seiten der Serumneutralisationstest empfohlen (DUFFY, WOLLY und NOTLING, 1948, MACE und COTEZ, 1949, MECINSKA, 1954, WHO, 1954, LEPINE, 1954, OHDER, 1958, WILCOX und HUBBARD, 1958). Neben der Maus werden als Versuchstiere angeführt: Kaninchen, Meerschweinchen, Goldhamster und Ratte (SCHLEGEL, 1926, GILDEMEISTER, HAAGEN und WALDMANN, 1939, SCHAAF, 1941, RIVERS, 1948, RHODES und ROOYEN, 1949, WHO, 1950, BRANDENBURG, 1952, HARMS und HOBIGK, 1953, SCHULZE, 1953, FIELD, 1954, AMITROW, 1956, REAGAN, YANCEY, CHAN, BRUECKNER, 1956, OSHIMA, TAKEHARA und TAGAMATSU, 1957, OHDER, 1958). Der einfache Tierversuch gilt dann als spezifisch für Tollwut, wenn im Gehirn der Versuchstiere Negri'sche Körperchen nachgewiesen werden (RIVERS, 1948, MOHR und ENIGK, 1952, GRIEM, 1953).

Die Stabilität des Tollwutvirus

Die unter Punkt (1) als Ursache von Fehlergebnissen im Tierversuch genannten Gründe finden ihren Niederschlag in einer Reihe von Arbeiten, die sich mit der Stabilität des Tollwutvirus beschäftigen. Danach wirken sich folgende natürliche physikalische und biologische Einflüsse mehr oder weniger stark auf die Widerstandsfähigkeit des Virus aus:

1. Die Temperatur, KUWERT und LIEBENOW (1959) geben an, daß bei 56° C nach 5 Stunden, bei 37° C nach 120 Stunden und bei 18° C nach 23 Tagen keine Infektiosität in der 10 %igen Virus fixe-Mäusegehirnsuspension mehr nachweisbar ist. In 1 %iger Gehirnaufschwemmung hält sich das Virus bei 60° C 2 Minuten bei 37° C 24 Stunden und bei 4° C, wenn es gegen Eintrocknung geschützt wird, wochenlang infektionstüchtig. Im gefrorenen Zustand aufbewahrte Gehirnteile halten das Virus monatelang virulent (GILDEMEISTER, HAAGEN und WALDMANN, 1939). Von Gewebe befreites Virus wird sehr schnell inaktiviert (RIVERS, 1948).

2. Die Fäulnis schädigt das Virus nur sehr langsam (GALTIER, TRAVALI und RATZ, 1926, MAZZEI, 1926, REMLINGER, 1926). Vergrabene Kadaver enthalten noch nach Monaten genügend Virus für den Tierversuch (GILDEMEISTER, HAAGEN und WALDMANN, 1939, SCHELLNER, HÄRTL und OSTHOFF, 1954). JONESCU (1943) sieht die Wirkung der Kältekonservierung des Lyssavirus in der Herabsetzung der Keimfähigkeit von Bakterien und in der Hemmung normaler autolytischer Vorgänge. Bis zu 10° C gibt es kaum eine Autolyse; bei 50° C wird sie bereits gehemmt (Zerstörung der normalen autolytischen Fermente). JONESCU (1943) berichtet, daß

das Tollwutvirus unter Lichtabschluß bei 18° C z. T. 3 - 4 Monate, bei 37° C bis zu 9 Tagen haltbar ist. Makroskopisch zeigen sich im letzten Fall am Gehirn schon nach 24 Stunden die Zeichen der Zersetzung. Bei alleiniger Temperatureinwirkung von 37° C auf das Tollwutvirus läßt sich nach 4 Stunden ein Titerverlust von 37 - 80 % feststellen. Wirken gleichzeitig die Fermente Rhozym P 11, Proteinase 15, Protease und Proteinase mit, so kommt es zu einem Titerverlust von 88 - 99 % unter gleichen Bedingungen (THOMPSON, 1957).

3. Bei einem ph-Wert von 7,0 ist das Virus bei 4° C nach 41 Tagen zu 99 % inaktiv. Eine Restaktivität bleibt jedoch erhalten. Bei ph 8,0 bleibt das Virus 34 Tage, bei ph 10,0 24 Tage aktiv. Der ph-Wert des Gehirns fällt im allgemeinen von ph 7,6 am ersten bis zu ph 7,0 am 15. Tag bei 37° C und normaler Autolyse (JONESCU, 1943).

4. Sonnenlicht und ultraviolette Strahlen vernichten das Virus sehr schnell (LEVINSON, MILZER, SHANGHNESSY und OPPENHEIMER, 1944 RIVERS, 1948). Nach Angaben von anderer Seite beeinflußt jedoch direkt auffallendes Sonnenlicht auf eine Virus fixe-Emulsion die Aktivität nicht (WASCHKUHN, 1918).

5. Langsames Eintrocknen inaktiviert das Virus in 10 Tagen (GILDEMEISTER, HAAGEN und WALDMANN, 1939); schnelles Eintrocknen über Schwefelsäure nach 24 Stunden (WASCHKUHN, 1918).

6. Unter Sauerstoffabschluß bleibt das Virus länger erhalten als bei Sauerstoffzutritt (KRAUS, GERLACH und SCHWEINBURG, 1926).

III. Der serologische Nachweis des Erregers oder von Erregersubstanzen

Wenn man von dem später zu besprechenden Nachweis spezifischer Antikörper als Folge einer Infektion oder der Zufuhr von Antigen und von dem in Rahmen des Tierversuches angeführten Neutralisationstest absieht, findet man in der zur Verfügung stehenden Literatur folgende Möglichkeiten eines serologischen Nachweises von Tollwuterreger oder von - erregersubstanzen:

1. Die Haemagglutination und ähnliche serodiagnostische Methoden.
2. Die Färbung des Tollwutantigens mit fluroreszierenden Antikörpern.
3. Die Komplementbindungsreaktion.
4. Die Präzipitation.

1. Die Diagnose der Tollwut mit Hilfe der Haemagglutination

Seit HIRST (1942) sowie MCCHELLAND und HARE (1941) gleichzeitig die Beobachtung machten, daß Hühnererythrozyten vom menschlichen Influenzavirus agglutiniert werden, und daß eine solche Haemag-

glutination durch das entsprechende Antiserum gehemmt werden kann, sind viele Versuche über dieses Phaenomen durchgeführt worden. Die Untersuchungen haben gezeigt, daß nicht nur das Influenzavirus Erythrozyten vom Huhn zu agglutinieren vermag, sondern daß eine solche Aktivität auch bei anderen Viren, bei Rickettsien und bei einigen Schizomyzeten zu finden ist. Daneben ist bekannt geworden, daß auch Blutkörperchen anderer Tierarten als die des Huhnes agglutiniert werden können (NANI, 1951).

"Kaum zufällig und im hohen Grade auffallend ist nun aber die Tatsache, daß neurotrope Virusarten anscheinend mit Erythrozyten nicht zu reagieren vermögen, d. h. das Hirst'sche Phaenomen nicht ergeben" (HALLAUER, 1950). Die Ursache ist unbekannt. Daß eine Haemagglutination durch gewebliche Inhibitoren oder Antikörper gehemmt werden könnte, wird dadurch unwahrscheinlich, daß derartige Hemmstoffe und Antikörper im Hühnerembryonen ohnehin in Wegfall kommen dürften (HALLAUER, 1946).

In der zur Verfügung stehenden Literatur wird mit einer Ausnahme festgestellt, daß eine Diagnose des Tollwutvirus mit Hilfe der Haemagglutination nicht möglich ist. NANI (1951) verwendet bei seinen Untersuchungen Gehirnsuspensionen von Virus fixe-infizierten Kaninchen. Die Blutkörperchen von Kaninchen, Meerschweinchen, Huhn, Schwein, Schaf, Rind, Pferd und Menschen werden gegen das Tollwutantigen ausgewertet. Trotz Durchführung der Haemagglutinationsversuche bei verschiedenen Reaktionstemperaturen und Einschaltung entsprechender Kontrollen zeigt sich keine spezifische Haemagglutination. Es wird lediglich eine unspezifische Haemagglutination der Erythrozyten von Kaninchen und Schwein beobachtet. MECINSKA (1954) arbeitet mit Erythrozytensuspensionen von Pferd, Rind, Schaf, Kaninchen, Schwein, Meerschweinchen, Mensch und verwendet ein nach der Methode von Casals und Palacios hergestelltes Antigen. Die besten Ergebnisse liefern die Erythrozyten von Pferd, Rind, Kaninchen und Schaf. Die Kontrollantigene bleiben negativ. MECINSKA (1954) kommt zu dem Schluß, die Haemagglutination mit 0,5 %iger Pferde- oder Rindererythrozytensuspension und mit einem Antigen nach Casals und Palacios kann dazu dienen das Tollwutvirus im Gehirn nachzuweisen. Negative Ergebnisse erzielt TRUBINA (1957) mit der Haemagglutination, die unter verschiedenen Temperaturen, bei verschiedenen ph-Werten und mit Erythrozyten von Eintagskücken, Schaf, Meerschweinchen, Kaninchen, Ratte, Maus, Hund, Frosch und Mensch durchgeführt wird. TRUBINA (1957) stellt fest, daß die Haemagglutination für die Diagnose der Tollwut ungeeignet ist. STARKE und SEIDL (1958) benützen bei ihren Haemagglutinationsversuchen Virus fixe-Stämme mit hohem Infektionstiter. Verwendet werden eine 10 %ige Gehirnaufschwemmung und 2 %ige Erythrozytensuspensionen der Spezies Huhn, Kaninchen, Schaf, Meerschweinchen, Pferd, Rind, Schwein, Hund, Katze, Mensch, die z. T. mit Papain vorbehandelt werden. Die verwendeten Virusstämme reagieren mit den verschiedenen Erythrozyten entweder nicht oder nur unspezifisch. Versuche mit dem eiadaptierten Flury-Virus verlaufen analog. Trotz dieser Untersuchungsergebnisse kommen die Autoren zu dem Schluß, daß das Tollwutvirus noch nicht endgültig in die Reihe der nicht

agglutinierenden Viren einzuordnen sei. Negative Ergebnisse erklären sie mit einem zu kleinen Infektionstiter, die unspezifischen Resultate mit der Wirkung unspezifischer Stoffe, die sie bereits im Hühnerembryonenmaterial vorhanden glauben.

Der indirekte Haemagglutinationstest, wie ihn z. B. CARMICHAEL und SARKAR (1958) bei der Hcc sowie FRIEDMANN und BENNET (1957) zur Diagnose und Typisierung von Adenoviren vorschlagen, ist eine neuere Methode zum Nachweis spezifischer Antigene. Bei diesem Test werden die durch Adsorption des Antigens sensibilisierten Erythrozyten mit entsprechenden Antiserum zum Ansatz gebracht. Untersuchungen auf diese Weise die Haemagglutination für die Tollwutdiagnose nutzbar zu machen sind in der zur Verfügung stehenden Literatur nicht zu finden.

In die gleiche Richtung weisen russische Versuche. Es werden anstelle der roten Blutkörperchen Bakterien, die mit virushaltigem Material beladen sind, durch Hyperimmunserum agglutiniert. WAINBERG, FRENKMAN und PARUSCHTSCHIK (1951) empfehlen die Methode für eine schnelle Tollwutdiagnose am toten und lebenden Tier. Als Ausgangsmaterial verwenden sie Gehirne von toten Tieren und Speichel von lebenden Tieren. Das Tollwutvirus des Untersuchungsmaterials wird dabei an Typhusbakterien adsorbiert und diese Bakterien durch Tollwuthyperimmunserum vom Kaninchen agglutiniert. Mit einem relativ kleinen Untersuchungsmaterial aus der Praxis (20 Gehirne und 23 Speichelproben) kommen die Autoren angeblich zu hervorragenden Ergebnissen. Den Nachprüfungen von TRUBINA (1957) halten die Angaben jedoch nicht stand. Ihre Versuche mit Antigen von Speicheldrüsen und Gehirnen liefern keine positiven Ergebnisse.

2. Färbung des Tollwutantigen mit fluorescierenden Antikörpern

Durch die Möglichkeit mit Hilfe fluorescierender Antikörper das Tollwutantigen nach Antigen-Antikörperbindung am Ort seiner Bildung oder Ablagerung sichtbar zu machen, tritt eine diagnostische Technik in Erscheinung, welche die Geschwindigkeit der Histologie und die Exaktheit der Biologie einschließt (POETSCHKE, 1960). Fluorescenz ist die Eigenschaft eines Körpers bei Bestrahlung mit kurzwelligem Licht ein langwelligeres (andersfarbenes) Licht auszustrahlen. Das Erregerlicht kann unter Umständen also unsichtbar sein.

Ein Fluorescenzfarbstoff ist dann gut brauchbar, wenn das Maximum seines abgegebenen Lichtes weit genug vom Maximum seines Erregerlichtes entfernt ist. Fluorescenzfarbstoffe gibt es heute in großer Zahl (RIGGS, SEIWALD, BURKHALTER, DOWNS und METCALF, 1957 , UEHLKE, 1958). Der am häufigsten verwendete ist das Fluorescein-Isothiocyanat (RIGGS, SEIWALD, BURKHALTER, DOWNS und METCALF, 1957, MARSHALL, EVELAND und SMITH, 1958).

POETSCHKE (1960) gibt ein Bild zur Technik der Färbung: Die gereinigten und wenn möglich konzentrierten Antikörper werden mit einem Fluorescenzfarbstoff gekoppelt. Danach entfernt man den nicht

gebundenen Farbstoff. Die so markierten Antikörpermoleküle werden nun an homologe Antigene gebunden. Unspezifische Bindungen kommen vor und müssen durch Kontrollen nachgewiesen werden. Die Bindungsstellen leuchten unter dem UV-Mikroskop hell auf, während das übrige Feld dunkel bleibt, oder nur eine schwache Auto-Fluorescenz zeigt. Zur Kontrolle läßt man die Antikörper auf ein anderes Antigen einwirken; dabei darf keine Fluorexcenz auftreten.

Die Tollwutdiagnose mit Hilfe fluorescierender Antikörper beschreiben GOLDWASSER und KISSLING (1958). Es werden Mäuse i.c. infiziert (Virus fixe und einige Straßenvirusstämme), die man nach Erkrankung tötet. Das Gehirn wird entnommen und Ausstriche von Querschnitten, die auch vom Hyppocampus stammen, angefertigt. Diese Ausstriche werden mit dem spezifischen fluoreszierenden antikörperhaltigen Serum behandelt. Das hierzu benutzte Tollwutimmunserum stammt von Menschen, die eine Schutzimpfung hinter sich haben; außerdem wird ein gereinigtes und angereichertes Tollwuthyperimmunserum der Firma Lederle verwendet. Es ist nach GOLDWASSER und KISSLING (1958) mit dieser Methode möglich, sowohl Virus fixe als auch Straßenvirus selbst bei Nichtvorliegen von Negri'schen Körperchen zu demonstrieren. Die fluorescierenden Partikel sind hinsichtlich ihrer Größe beim Straßenvirus sehr unterschiedlich; sie haben Nervenzellkerngröße, sind z. T. größer, z. T. aber auch kaum sichtbar. Bei Virus fixe erscheinen die fluorescierenden Partikel als viele kleine Teilchen, wie sie auch beim Straßenvirus zu finden sind. Es scheint, so schließen die Autoren, daß die Färbetechnik für die schnelle Diagnose der Tollwut bei Negri-negativen Tieren zweckmäßig ist. MCQUEEN (1959) beschreibt den Test zum Nachweis von Antigenen im Gehirngewebe natürlich infizierter Tiere. 23 verschiedene Tierarten werden in 884 Proben mit dieser, als praktische Schnellmethode für die Routineuntersuchung erachteten Technik untersucht. Es besteht völlige Übereinstimmung mit dem Tierversuch in 82 positiven Fällen, während die Negri'schen Körperchen nur in 76 Fällen nachweisbar sind. Falsche positive Reaktionen gibt es nach Meinung des Autors nicht. ETCHEBARNE, BERNAL, und LAYTON (1960) konjugieren gereinigtes Tollwutimmunserum vom Pferd mit Fluorescein-Isothiocyanat. Mit Hilfe dieser fluorescierender Antikörper färben sie Gehirnausstriche tollwutinfizierter Hunde und Mäuse. Die Methode zeigt sich bei der Tollwut, bei der es auf eine exakte Diagnose ankommt, als brauchbar.

3. Die Diagnose der Tollwut durch die Komplementbindungsreaktion

Obwohl die Tollwut eine der ersten Viruskrankheiten ist, bei der serodiagnostisch gearbeitet wurde (TRUBINA, 1957) hat die Komplementbindungsreaktion (KBR) in der Tollwutdiagnostik bis zu Beginn des letzten großen Seuchenzuges keine Bedeutung erlangt. Auch bei dem Versuch, die Erreger anderer Virus-Enzephalitiden mit Hilfe der KBR nachzuweisen, ist man zunächst auf Schwierigkeiten gestoßen. Es sind die verschiedensten Versuche unternommen worden, um die antikomplementären und unspezifischen Eigenschaften, die bei Verwendung von Gehirn als Antigenmaterial zu erwarten sind, zu beseitigen.

Das gilt für das Borna-Virus (IMIG, 1928, SPROCKHOFF und NITSCHKE, 1955), das Herpes-Virus (TAKAKI, BONIS und KOREF, 1926, TANG und CASTANEDA, 1929), das St. Louis Enzephalitis-, das japanische B-Enzephalitis- , das Louping-ill-Virus, für das Virus der lymphozytären Choriomeningitis und den Osttyp des Pferde-Enzephalomyelitis-Virus (TAKAKI, 1926,CASALS und PALACIOS, 1941, BOER und COX, 1947).

Die ersten Versuche, mit Hilfe der KBR die Tollwut nachzuweisen, lieferten negative Ergebnisse. HELLER und TOMARKIN (1907), die mit Immunserum vom Kaninchen arbeiten, sowie FRIEDBERGER (1907), der Pferdeimmunserum verwendet, gelingt es mit Extrakten aus Tollwutgehirnen nicht spezifische Bindungen zu erhalten. Negativ verlaufen auch die Versuche von CENTANNI (1908) sowie DONATI und SALTA (1908) mit Immunserum vom Kaninchen. BARONI, CIUCA und JONESCU-MIHAIESTI, (1908) berichten über negative Ergebnisse mit dem Serum von drei Kaninchen und einem Schaf gegen Wasserextrakte von Virus fixe-Material. DOBROWOLSKAJA, (1910) arbeitet mit den Seren immunisierter Hunde und kann ebenfalls keine spezifische komplementbindende Antigene nachweisen. Das Komplement wird in vielen Fällen auch bei Auswertung von normalen Hundeserum gegen Gehirn- und Speicheldrüsenextrakt gebunden. BERRY und MANN (1910) erhalten mit Kaninchenimmunserum negative Ergebnisse. Als Antigen benutzen sie Wasserextrakte von Virus-fixe- infizierten Gehirnen und Normalgehirnen. Die KBR-Versuche von MOSES (1909) mit Tollwut fallen nenegativ aus. KOZEWALOFF (1910) benutzt zur KBR bei Tollwut Kaninchenserum, das den Tieren 8 - 9 Tage nach der Infektion mit Virus fixe und nach Auftreten deutlicher Lähmungserscheinungen entnommen wird. Als Antigen verwendet KOZEWALOFF (1910) alkoholische und wässrige Extrakte aus Gehirnen und Leber von an Lyssa verendeten Kaninchen. Die Ergebnisse sind durchweg negativ. Einige Male zeigen sich unspezifische Bindungen. MICHALKA (1927), HOTTA (1928), MARIE und URBAIN (1929), KONDO und OBANDA (1929) können mit Hilfe der KBR die Tollwut nicht nachweisen. Negative Resultate erhält auch GLUSMANN und SOLOWJOWA (1927). TANG und CASTANEDA (1929) immunisieren Kaninchen nach verschiedenen Methoden und benutzen Koch- und Glyzerinantigene. Das Ergebnis ihrer Untersuchung ist negativ. Die Arbeit von SCHULTZ, BULLOCK und BREWER (1928) führt, obwohl sie KRAUS und TAKAKI (1926) sowie KRAUS und MICHALKA (1926) sorgfältig kopieren, zu negativen Ergebnissen. Die von IMIG (1928) zwischen Antigenen von Wutkaninchen und Serum immunisierter Kaninchen beobachteten positiven Reaktionen sind unspezifisch, da sie sich auch bei Tieren zeigen, die mit Normalgehirnen behandelt sind.

Zu positiven Ergebnissen in Versuchen mit der KBR kommen als erste NEDRIGAILOFF und SAWTSCHENKO (1911) mit Speicheldrüsenextrakt eines Menschen und eines Hundes, die an Tollwut gestorben sind. Extrakte normaler Speicheldrüsen liefern negative Ergebnisse. Das Immunserum stammt vom Pferd. BERTARELLI (1913) benutzt das Immunserum von Kaninchen und weist eine spezifische Komplementbindung bei Tollwut nach. ZELL (1913), der das Serum von Straßen-

virus-infizierten Tieren bei Gegenwart von Speicheldrüsenextrakt infizierter Tiere prüft, erhält schon vor Auftreten klinischer Symptome positive Ergebnisse. KOSTREZEWSKI (1920) benutzt frisch bereitete Extrakte von Virus-fixe-Infiziertem Rückenmark als Antigen und erhält Komplementbindung mit Seren eines großen Prozentsatzes von Personen, die gegen Tollwut immunisiert sind. Das positive Ergebnis ist von der Art der Immunisierung abhängig. TAKAKI, BONIS und KOREF (1926) berichten, daß sie die Tollwut mit Hilfe der KBR nachweisen können. KRAUS und MICHALKA (1926) gewinnen ihre Seren von Kaninchen. Sie verwenden Koch- später auch Glyzerinextrakte aus dem Gehirn von Virus-fixe-infizierten Kaninchen als Antigen. Mit diesen Antigenen und positiven Seren erzielen sie spezifische Komplementbindungen. Unspezifische Hemmungen verschwinden spätestens 24 Stunden nach Ablauf der Reaktion, während die spezifischen Hemmungen bestehen bleiben. KRAUS und TAKAKI (1926) bestätigen diese Befunde. HOROWITZ-WLASSOWA (1926) kann weder im Serum von Menschen, die eine Pasteur-Impfung durchgemacht haben, noch im Serum von Tieren, die s.c. immunisiert worden sind komplementbindende Antikörper nachweisen. Z.T. bindet das Serum bis zu 5 Einheiten Komplement. Mit Seren von i.v. mittels Speicheldrüsenextrakt immunisierten Kaninchen erhält der Autor eine Bindung, wenn diese Seren gegen Tollwutgehirne getestet werden. KOLMER und TRIST (1916) schreiben dem Normalserum von Kaninchen eine nicht unerhebliche unspezifische Fähigkeit der Komplementbindung zu. GREVAL (1933) gibt bei der Auswertung von Hammelimmunserum gegen Tollwutantigen positive Ergebnisse bekannt.

CASALS und PALACIOS (1941) entwickeln als erste eine Standardmethode zur Aufarbeitung der Antigene und zur Gewinnung von Immunserum (Meerschweinchen und Kaninchen), mit denen sie spezifische Ergebnisse erzielen. Allerdings ist die Antigenbehandlung für die Praxis ziemlich kompliziert. Unspezifische Antikörper verschwinden aus Kaninchen- und Mäuseseren, wenn man sie 20 Minuten bei 65° bzw. 60°C inaktiviert. In dem Bestreben die von CASALS und PALACIOS (1941) angegebene Technik zu vereinfachen haben BERNKOPF und NACHTIGAL (1943) eine eigene Antigenaufbereitung beschrieben, mit der sie Gehirne von Meerschweinchen, Mäusen, Kaninchen und Hunden verarbeiten. Das Immunserum stammt von Meerschweinchen. ESPANA und HAMMON (1947) modifizieren die Technik von CASALS und PALACIOS (1941) ebenfalls. Sie prüfen in der KBR lyophilisierte, extrahierte und wieder in Lösung gebrachte Antigene von infizierten Mäusegehirnen gegen Meerschweinchenimmunserum in zweifacher Verdünnung und erreichen Titer bis zu 1 : 512. In 500 Fällen werden diese Antigene gegen Normal- und Rekonvalescentenseren geprüft, ohne daß es zu unspezifischen Reaktionen kommt. Obwohl keine Angaben über die Antigenherstellung und die Durchführung der KBR gemacht werden, scheinen sich LIPTON und FREUND (1950) ebenfalls an die Methode von CASALS und PALACIOS (1941) anzuschließen. Im Tollwutantiserum vom Kaninchen weisen sie komplementbindende Titer bis zu 1 : 1280 nach. Zweifellos gute Ergebnisse erzielen GALLIA (1946), KIRK und ECKER (1949) sowie MACE und CORTEZ (1949) bei

der KBR zum Nachweis der Tollwut. MACE und CORTEZ (1949) stellen fest, daß Hundeserum, aus unbekannter Ursache, immer antikomplementär reagiert. BELL, BOER, HAZZ und COX (1950) dient benzolextrahiertes Gehirnmaterial von Mäusen, die mit Virus fixe infiziert worden sind, als Antigen bei der Untersuchung von Patientenseren auf komplementbindende Antikörper. Die Autoren verwenden die Technik von Kolmer und Boerner (Aufbewahrung im Kühlschrank). BRANDENBURG (1952) empfiehlt für eine sichere und spezifische KBR die genügend empfindliche Einstellung des Komplements und der Einhaltung bestimmter Lösungszeiten, die sorgfältige Bereitung der Antigene und das Mitführen ausreichender Kontrollen. Der Autor erhält positive Komplementbindung mit Seren von immunisierten Kaninchen, Mäusen und vom Menschen. Zur Ausschaltung starker Eigenhemmungen der Seren empfiehlt er die Verdünnung derselben und das Einhalten bestimmter Inaktivierungstemperaturen. Der durch genügend scharfes Zentrifugieren gewonnene Überstand aus Emulsion von Mäusegehirnen dient als Antigen.

1953 erscheinen die ersten Arbeiten, die sich mit der Tollwutdiagnose bei erkrankten und verdächtigen Tieren mit Hilfe der KBR eingehender beschäftigen. In folgender Übersicht sind die seit 1953 erschienenen Arbeiten einschließlich der verwendeten Techniken und der erzielten Ergebnisse zusammengestellt:

Tabelle I

Autoren	Antigen und Immunserum	Durchführung der KBR	Ergebnisse
ANDO ISHII IRIZAWA SHIMADA KATO MURAHAMI 1953	40 %-ige Gehirnsuspension (Cortex). Wasserbad 1 Stunde bei 40°C; 15 Minuten bei 10 000 U./Min. zentrifugieren. Überstand = Antigen. Antigen = Gehirne von Hunden. Immunserum vom Meerschweinchen.	3 %-ige Erythrozytensusp. 2 Einh. Kompl. Antikompl. Wirkung verschwindet bei Zusatz von Meerschweinchenserum. Ablesen nach 18 Stunden bei 4-8°C, nach 2 Stunden bei 37°C.	128 Gehirne. KBR und Tierversuch stimmen überein (4 Ausnahmen). Speicheldrüsenmaterial wirkt antikomplementär.
BENAZZI MANTOVANI 1953	5 %-ige Lösung getrockneten und pulverisierten Gehirnmaterials. 15 Minuten bei 2 500 U./Min. zentrifugieren. Überstand = Antigen. Antigen = Gehirne von Mäusen. Immunserum vom Hund.	2 Einh. Kompl. Antigenverd. 1:2 bis 1:32. Ablesen nach Haemolyse der negativen Kontrollen bei 37°C.	Trotz antikompl. Wirkung der Seren ist es möglich Antikörper gegen Tollwut nachzuweisen. Komplementb. und neutralisierende Antikörper liefern parallel laufende Ergebnisse.
MECINSKA 1954	15 %-ige Gehirnsuspension. 30 Minuten bei 2 500 U./Min. zentrifugieren. Überstand wiederholt auftauen und eingefrieren. - Oder 30 Minuten bei 3 500 U./Min. zentrifugieren. Überstand = Antigen Antigen = Gehirne von Mäusen. Immunserum vom Kaninchen.	4 %-ige Erythrozytensusp.	kein Hinweis
CAPPONI SUREAU 1955	wie ANDO und Mitarbeiter. Immunserum vom Kaninchen und Meerschweinchen	Technik nach Kolmer	Es gibt einige zweifelhafte Ergebnisse.
DEPOUX MERVEILLE 1956	wie ANDO und Mitarbeiter. Antigen = Gehirne von Meerschweinchen, Mäusen, Hunden, Affen und Menschen. Immunserum vom Kaninchen.	wie ANDO und Mitarbeiter.	Antigen oft antikompl., besonders zersetztes Material. Experimentell infizierte Tiere binden das Kompl., tollwutfreie Gehirne nicht. 1. KBR negativ = keine Tollwut. 2. Wenn die KBR positiv ist liegt in 2/3 der Fälle Tollwut vor, in 1/3 der Fälle nicht. Die Methode ist von zweifelhafter Spezifität.
TRUBINA 1956	Aufschließen des Antigens durch wiederholtes Eingefrieren und Auftauen sowie durch Ätherextraktion der Speicheldrüse und wiederholtes Zentrifugieren der Mundhöhlenspülflüssigkeit. Antigen von Kaninchen, Ratten und Mäusen. Immunserum von Schaf, Kaninchen und Meerschweinchen.	Ablauf der Reaktion bei 4-6°C. Ablesen nach 18-24 Stunden.	Ätherantigene geben spezifische Ergebnisse. Wasserextrakte liefern zu 84% Ergebnisse, die mit den klassischen Untersuchungsmethoden übereinstimmen. Mundspülproben sind zum Nachweis der Tollwut in der KBR ungeeignet. Z. Zt. ist von den serologischen Untersuchungsmethoden zur Tollwutdiagnose die KBR am sichersten.

Tabelle II

Autoren	Antigen und Immunserum	Durchführung der KBR	Ergebnisse
THOMPSON 1957	10 %-ige Gehirnsuspension. Zentrifugieren bei 1 200 g 15 Minuten lang. Überstand = Antigen. Antigen = Gehirne von Kaninchen. Immunserum von der Fa. Lederle und vom Kaninchen.	3 %-ige Erythrozytensusp.	kein Hinweis
FALKE UHLMANN 1957	10 %-ige Gehirnsuspension. Aufschließen des Antigens: 1. 30 Minuten bei 3 000 U./Min. zentrifugieren. 2. Fraktioniertes Zentrifugieren. 3. Ätherextraktion nach Casals und Palacios. 4. Der Überstand von (1) wird mit Ammoniumsulfat ausgefällt, das Präzipitat dialysiert und nochmals zentrifugiert. Antigen = Gehirne von Versuchstieren. Immunserum von der Maus.	4 %-ige Erythrozytensusp. 2 Einh. Kompl. Bindungs- und Lösungszeit je 30 Minuten. Bei starker Eigenhemmung der Seren nochmals inaktivieren und Antigene scharf zentrifugieren.	Beste Ergebnisse mit der Antigenbehandlung nach (1) und (2). Mit Antigen nach Methode (4) steigt der komplementb. Titer um 2 Verdünnungsstufen. Das nachweisbare komplementb. Antigen erscheint nicht vor Anstieg des Virustiters auf 10^{-4} i. E. Die Titer der Straßenvirusstämme schwanken stark. Das ist für den Ausgang der KBR von Bedeutung. Nach Ausfällung kann auch mit schwachtitrigen Antigenen gearbeitet werden.
UEKI KATO OISHI MURAHAMI SHIMADA 1957	20 %-ige Gehirnsuspension. Im Wasserbad 1 Stunde bei 40°C, dann 15 Minuten bei 12 000 U./Min. zentrifugieren. Überstand = Antigen. Antigen = Gehirne von Mäusen. Immunserum vom Meerschweinchen.	4-5 %-ige Erythrozytensusp. 2 Einh. Kompl. Bindungszeit bei 37°C = 120 Minuten.	1. In der zeitlichen Reihenfolge lassen sich die Untersuchungsmethoden hinsichtlich der positiven Ergebnisse wie folgt einordnen: a) Virusisolierung b) Nachweis des komplementb. Antigens c) Nachweis der Negrikörperchen. Abstand zwischen den Methoden 1-2 Tage. 2. Das komplementb. Antigen erscheint nicht vor Anstieg des Virustiters auf $10^{-2,7}$ i. E. 3. Es werden starke Unterschiede in der Virulenz, dem erstmaligen Nachweis der komplementb. Antigene und dem Auftreten der Negrikörperchen beobachtet.
BINDRICH KUWERT 1957	20 %-ige Gehirnsuspension. 12 Stunden eingefrieren, dann auftauen und 30 Minuten bei 3 000 U./Min. zentrifugieren. Überstand = Antigen. Antigen = Gehirne von künstlich und natürlich infizierten Versuchs-, Haus- und Wildtieren. Immunserum vom Hund.	4-5 %-ige Erythrozytensusp.	164 Gehirne. 5 in der KBR positive Fälle sind histologisch und im Tierversuch negativ. Die Straßenvirustiter sind niedriger als die Virus fixe-Titer. Lange Lagerung schwächt die Anti gentiter ab. Bakteriell stark zersetzte Gehirne gestatten keine einwandfreie Diagnose.
BULLING 1957	16,6 %-ige Gehirnsuspension. Material aus verschiedenen Partieen des Groß- und Kleinhirns, sowie des Hirnstammes. Es wird 3mal eingefroren und aufgetaut und 30 Minuten bei 10 000 U./Min. oder 45 Minuten bei 3 000 U./Min. zentrifugiert. Überstand = Antigen. Antigen = Gehirne von Haus- und Wildtieren. Immunserum vom Kaninchen.	3 %-ige Erythrozytensusp. Sorgfältige Auswertung des Kompl.	103 Gehirne. Tierversuch, Histologie und KBR stimmen weitgehend überein. Die KBR ist dem Tierversuch in den positiven Fällen überlegen. Stark zersetzte Gehirne zeigen in der Komplementauswertung Hemmung bis zur höchsten Komplementmenge. Die KBR auf Tollwut kann in der Routinediagnostik angewendet werden.

Tabelle III

Autoren	Antigen und Immunserum	Durchführung der KBR	Ergebnisse
SCHINDLER 1957	20 %-ige Gehirnsuspension. Antigen = Gehirne künstlich infizierter Tiere Immunserum von Kaninchen und Meerschweinchen	4 %-ige Erythrozytensusp. 2 Einh. Kompl.	Konzentration des löslichen Antigens durch Zentrifugieren bei 50 000 U./Min. nach 1 Stunde im unteren Drittel der Flüssigkeitssäule. Die Diagnose der Tollwut ist mit Hilfe der KBR möglich.
ENDE POLSON TURNER 1957	1. 20 %-ige Gehirnsuspension. Zentrifugieren bei 2 000 U./Min. 30 Minuten; dann 1 Stunde bei 15- 20 000 U./Min. Präzipitation bei ph 4, 3. Das Präzipitat wird suspensiert, der nicht lösliche Teil getrennt. 2. 20 %-ige Gehirnsuspension (nach Casals u. Mit.) Antigen = Gehirne von Mäusen. Immunserum von Maus und Kaninchen.	wie Casals und Palacios. Bei Eigenhemmung der Seren werden diese ein zweites Mal inaktiviert oder zentrifugiert.	kein Hinweis
TAGUCHI MOTO KATA TAKEHARA URIN 1957	wie ANDO und Mitarbeiter.	kein Hinweis	114 Gehirne. In Fällen, in denen kein Virus isoliert wird, ist auch die KBR negativ und es können keine Negri'schen Körperchen nachgewiesen werden. Je länger die Gehirne aufbewahrt werden, desto höher ist ihr Titer in der KBR. Das scheint auf die lösliche Natur des Antigens hinzuweisen.
DEPOUX ORIO 1958	wie ANDO und Mitarbeiter. Immunserum vom Kaninchen.	wie ANDO und Mitarbeiter	Formalinfixierte Gehirne wirken stark antikomplementär. Die Art der Antigenherstellung führt in Fällen von Straßenwut zu unsicheren Ergebnissen, ist also für die Tollwutdiagnose nicht brauchbar.
LINSERT TEMPLIN WOLTER 1959	20 %-ige Gehirnsuspension. Material vor allem aus Thalamus und Hirnstamm. Blutiges Material wird abgespült. Weitere Behandlung wie bei Bindrich und Kuwert. Antigen = Gehirne von Haus- und Wildtieren. Immunserum vom Hund.	4-5 %-ige Erythrozytensusp. 2 überschüssige Einh. Kompl.	108 Gehirne. In 28 KBR-positiven Fällen erfolgt eine Bestätigung durch den Nachweis von Negrikörperchen. Bakteriell stark zersetzte Gehirne eignen sich nicht für die Verwendung in der KBR. Prozentual hoch erscheinen die positiven Ergebnisse in der KBR bei negativen histologischen Befund (23,1 %). Die Prozentzahl ist als Versager bei histologischen Untersuchungen üblich. Die KBR erscheint bei der Routineuntersuchung bei Tollwut als zuverlässiges Diagnostikum.

Das lange vorhandene Problem der Beschaffung eines für die KBR geeigneten Hyperimmunserums besteht theoretisch heute nicht mehr. Gute Serumspender sind nach neuerer Auffassung der Hund (KUWERT, 1960), das Kaninchen und das Pferd (SARTORIUS und WINKLER, 1959). Zur Gewinnung der Seren werden bestimmte Immunisierungs-Schemata vorgeschlagen. Die bei Hund (KUWERT, 1960) und Schaf (SATORIUS und WINKLER, 1959) erreichten Höchstwerte sinken schnell wieder auf einen Restwert ab. Sinkt der spezifische komplementbindende Titer zu stark, so wird er von den unspezifischen Antigehirn-Antikörpern überdeckt, die einen Titer von 1:2 bis 1:4 erreichen können.

Auf der anderen Seite ist heute auch das komplementbindende oder lösliche Antigen weitgehend erforscht, und es scheint kein Problem mehr zu sein, mit experimentell infizierten Versuchstieren in der KBR zu arbeiten.

Das lösliche Tollwutantigen. Durch Adaption des Virus an das Säuglingsmäusegehirn gewinnt man ein Material mit hohem Gehalt an Virus- und komplementbindendem Antigen. Das komplementbindende oder lösliche Antigen hat nach Angabe von POLSON und WESSELS (1953) eine Partikelgröße von 12 mμ. Diese nicht infektiösen Partikel, die nach möglichst vollständiger Entfernung des Virus durch hochtouriges Zentrifugieren in der überstehenden Flüssigkeit bleiben, behalten den Großteil des Komplementbindungsvermögens der Originalsuspension. Die infektiösen Virusteilchen scheinen nur ein ganz geringes komplementbindendes Vermögen zu haben. Sprengt man das Virus mittels Ultraschall, so wird dabei nur eine geringe Menge löslichen Antigens frei; es dürfte also nicht Bestandteil des Virus sein (ENDE, POLSON und TURNER, 1957). Titrationen haben gezeigt, daß der Anstieg der Infektiosität dem Auftreten des löslichen Antigens vorangeht. Nach Erreichen des maximalen Infektionstiters vermehrt sich das lösliche Antigen jedoch weiter (ENDE, POLSON und TURNER, 1957, KUWERT, 1960). Die Sensibilitätsschwelle der KBR ist von einer bestimmten Titerhöhe des infektiösen Antigens abhängig. Ein positives Ergebnis ist in der KBR dann zu erwarten, wenn der Infektionstiter Werte von 100 LD 50/0,03 ml Impfdosis erreicht hat. FALKE (1960) nimmt an, daß ca 25 % des komplementbindenden Antigens an das lösliche und 75 % virusgebunden ist. Letzteres erschwert die Anwendung bei der Tollwutdiagnose in der KBR, weil es viele unspezifische Stoffe enthält.

Die höchste komplementbindende Antigenmenge findet man in Thalamus und Hirnstamm (BINDRICH, POTEL und KUWERT, 1958). Im Ammonshorn konnten BINDRICH, POTEL und KUWERT keine komplementbindenden Antigene nachweisen. Parallel zu den in der KBR nachweisbaren Titerhöhen gehen die geweblichen Veränderungen. In beiden Fällen zeigen Straßenvirus und Virus fixe deutliche Unterschiede: das Virus fixe neigt zur Ausbreitung (Akutität), das Straßenvirus zur Lokalisation (BINDRICH, POTEL und KUWERT, 1958).

Bei einem ph-Wert von 6,0 - 10,0 ist das lösliche Antigen stabil (ENDE, POLSON und TURNER, 1957, FALKE, 1960). Um die oben

erwähnte Sensibilitätsschwelle überschreiten zu können, ist es in einigen Fällen notwendig, das lösliche Antigen anzureichern. Man kann durch Präzipitation bei einem ph-Wert von 4,6 (ENDE, POLSON und TURNER, 1957) oder 5,0 (FALKE, 1960) z.B. mittels Ammoniumsulfat (FALKE, 1960) bei 40 %-iger Sättigung einen ca 33 %igen Reinigungseffekt (bezogen auf den N_2-Wert) erzielen. Allerdings kommt es dabei zu einem Antigenverlust von 1/2 bis 4/5. Das so angereicherte Antigen reicht aber zum Nachweis durch die KBR aus. Um eine ähnliche Anreicherung zu erzielen kann man auch das Rohantigen 120 Minuten bei 40 000 U./Min. zentrifugieren (FALKE, 1960). ENDE, POLSON und TURNER (1957) berichten, daß wiederholte Extraktionen mit Äther zu einem starken Verlust des löslichen Antigens, wiederholte Extraktionen mit Chloroform jedoch zu vollständigem Verlust des in der KBR feststellbaren Antigens führen.

Trypsin, Ribonuklease und Descxyribonuklease reduzieren das Komplementbindungsvermögen auf 2/3 bis 1/2 (ENDE, POLSON und TURNER, 1957). Protease 15, ein bakterielles Enzym, bewirkt eine 99 %ige Reduktion des aktiven Virus im Vergleich zu unbehandeltem Material. Auf das in der KBR wirksame Antigen hat das Enzym jedoch keinen Einfluß.

Die Inaktivierung des löslichen Antigens erfolgt bei 80°C nach einer halben Stunde (ENDE, POLSON und TURNER, 1957), bei 60°C zum größten Teil nach 20 Minuten (FALKE, 1960). Bei 4°C Temperatur zeigt es nach 14 Tagen einen Aktivitätsverlust von 25 % (FALKE, 1960) und bei -20 °C beträgt die Haltbarkeit mindestens 4 Wochen (ENDE, POLSON und TURNER, 1957, FALKE, 1960).

Sowohl Virus als auch lösliches Antigen sind in der Lage, das Kaninchen zur Bildung von Antikörpern anzuregen, wobei letzteres stärker zur Produktion von komplementbindenden Antikörpern beiträgt als das Virus. Den durch lösliches Antigen hervorgerufenen Antikörpern fehlt jedoch das Neutralisierungsvermögen in vitro (ENDE, POLSON und TURNER, 1957).

Die eigentliche Bedeutung des löslichen Antigens ist unbekannt. Es mag von Interesse sein, daß es im infizierten Gehirn in größerer Menge vorhanden ist, als zu einer eventuellen Virussynthese notwendig wäre (ENDE, POLSON und TURNER, 1957).

4. Die Diagnose der Tollwut durch die Präzipitationsreaktion

Den ersten Versuch, mit Hilfe der Präzipitation die Tollwut nachzuweisen, unternimmt BURMEISTER (1915). Ausgangsmaterial für das Präzipitinogen ist ein mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellter und filtrierter Extrakt von Tollwutgehirnen. In keinem Fall kann eine Präzipitation nachgewiesen werden. LÄSSER (1927), der umfangreiche Untersuchungen über die Präzipitationsreaktion bei neurotropen Viren durchführt, ist ebenfalls nicht in der Lage, irgendwelche Anhaltspunkte für die Bildung spezifischer Präzipitine bei tollwutinfizierten und gegen Tollwut immunisierten Tieren (Kaninchen und

Schaf) zu finden. Mit Tollwutimmunserum vom Kaninchen erhält er Präzipitationen nicht nur gegen Tollwutantigenmaterial, sondern auch gegen Antigene anderer neurotroper Virusarten. Großen Wert legt LÄSSER (1927) auf das Aufschließen der Antigene und bedient sich dabei verschiedener Methoden: Kochantigen, Extrakt nach Pfeiffer sowie Glyzerin-Alkohol-Ätherextrakte. Faulige Normalgehirne liefern mit Lyssaimmunserum starke Ringbildung und können so eine spezifische Präzipitation vortäuschen. SCHULTZ, BULLOCK und BREWER (1928) benutzen wie LÄSSER (1927) den Ringtest. In den von den Autoren untersuchten 24 Immunseren von Kaninchen können keine präzipitierenden Antikörper nachgewiesen werden.

Das Versagen der Reaktion kann verschiedene Gründe haben:

a) Es fehlen präzipitierende Antikörper, trotzdem in dem betreffenden Serum neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden (SCHULTZ, BULLOCK und BREWER, 1928).

b) Nur ein Teil der Antigene präzipitieren mit den Antikörpern des Immunserums. Dieses Phaenomen wird von FEINBERG (1958) mit Hilfe radioaktiver Antigene (Rinderserumalbumin) näher untersucht. Nach Ablauf der Reaktion sind 22 - 42 % der ursprünglich radioaktiven Stoffe im Überstand zu finden. Nach BURTIN (1956), der mit Menschenserumalbumin als Antigen arbeitet, wird 17 - 28 % des radioaktiv behandelten Antigens nicht präzipitiert. LANG und SCHWICK (1955) haben mit Hilfe der Immunelektrophorese und mit radioaktiv markiertem Antigen nähere Untersuchungen angestellt. Das nicht gebundene Antigen wandert im Stromfeld im Gel weiter, der Antigen-Antikörperkomplex bleibt liegen. Durch Radioaktivitätsmessung kann der Anteil gebundenen Antigens unter verschiedenen Bedingungen bestimmt werden.

c) Fehlen von genügenden Mengen an Präzipitinogenen (löslichen Antigenen).

Erst in den letzten Jahren ist die Präzipitationsreaktion im halbfesten Agarmedium zur Diagnose der Tollwut herangezogen worden.

Den Nachweis von Antigenen auf diese Art und Weise hat OUDIN (1946) eingeführt. Dabei wird ein in Röhrchen gegossenes Immunserum-Agargemisch mit löslichem Antigen überschichtet. In dem zwischen Immunserum-Agargemisch und löslichem Antigen bestehenden Agar-Gel kommt es als Folge einer spezifischen Präzipitationsreaktion zur Ringbildung. OUCHTERLONY (1948) modifiziert diese Technik: in den in eine Petrischale gegossenen Agar werden in bestimmter Anordnung Löcher gestanzt und die einen mit dem Antigenmaterial, die anderen mit dem Antikörper enthaltenden Serum gefüllt. Beide Partner diffundieren in das Agarmilieu und bilden im Falle einer spezifischen Reaktion einen deutlich erkennbaren Präzipitationsstreifen dort aus, wo sie in äquivalenten Mengen miteinander in Berührung kommen.

Die Ouchterlony'sche Technik wurde bereits bei einer Reihe von Viruskrankheiten sowohl zum Nachweis des Antigens als auch der Antikörper diagnostisch verwendet: Myxomatose und Fibromatose der Kaninchen, Staupe und Hcc der Hunde, lymphozytäre Choriomeningitis und Schweinepest (MANSI, 1957), Influenza (JENSEN und FRANCIS, 1953), zur Typisierung des Virus der MKS (BODEON, 1955), vesikuläre Stomatitis (BROWN und CRICK, 1958), Rinder- und Menschenpocken (GISPEN, 1955), infektiöse Bronchitis und Laryngotracheitis des Huhnes (WOERNLE, 1959), Tollwut (VILLEMOT und PROVOST, 1958, FRAS und GRMOVSEK, 1958, SHARMA, 1958).

Um zu einem optimalen Agar-Gel zu kommen haben WILSON und PRINGLE (1954) den Ouchterlony-Test eingehend untersucht. Sie bedienen sich bei der Auswertung der verschiedenen Einflüsse auf das Agar-Gel des menschlichen Gammaglobulins als Antigen und des entsprechenden Antiserums vom Kaninchen. Sie kamen zu folgenden Ergebnissen:

1. Ein zu visköser Agar (3-4%-ig) führt zur verspäteten Ausbildung der Präzipitationslinien. Die brauchbarste Konzentration liegt bei 1-2 %.

2. Zu starke Kochsalzkonzentrationen (13,6 %) führen zum Niederschlag des im Agar gelösten Methylorange. Wenn dem Agar kein NaCl zugesetzt wird, werden die Linien deutlicher.

3. Der optimale ph-Wert liegt zwischen 6,6 und 7,6; bei einem ph-Wert von 5,6 bildet sich um das Antigen ein Hof.

4. Bei Zimmertemperatur und bei 30,5°C treten die Präzipitationslinien erstmals am 3. Tag in Erscheinung, bei Kühlschranktemperatur am 4. Tag. Temperaturwechsel hat keinen Einfluß auf die endgültige Lage der Linien.

5. Der Abstand zwischen den Stanzlöchern wirkt sich auf das erste Sichtbarwerden der Linien aus: bei einem Abstand von 1,1 cm erscheinen diese nach 48 Stunden, beim Abstand von 1,3-1,6 cm nach 72 Stunden und beim Abstand von 2,7 cm erst am 12. Tage.

6. Die absolute und die relative Konzentration der Antigene und Antikörper spielt bei diesem Versuch eine nicht zu unterschätzende Rolle.

a) Mit Ansteigen der relativen Konzentration der Antigene wandert die Präzipitationslinie näher an das Antikörperreservoir, mit Ansteigen der relativen Konzentration der Antikörper zum Antigenreservoir.

b) Steigt die Konzentration der Antikörper, so erscheinen die Präzipitationslinien länger.

c) Mit gleichzeitigem Ansteigen von Antigen- und Antikörperkonzentration verbreitern und verdichten sich die Präzipitationslinien.

d) Je stärker eine der Reaktionskomponenten ist, desto eher neigt das Präzipitationsband zur Aufspaltung in mehrere Linien. Im Bereich niedriger Konzentration verschmelzen sie.

e) Bei niedriger Konzentration der Reagentien erscheinen die Präzipitationsbanden später.

Bei Vergleichsuntersuchungen zeigt sich, daß die Sensibilität der Präzipitation im Gel geringer ist als bei der konventionellen Präzipitationsmethode (WILSON und PRINGLE, 1954, EDLINGER, 1957).

Einer etwas modifizierten Oudin-Methode zum Nachweis der Tollwut bedienen sich ENDE, POLSON und TURNER (1957). Nach Injektion löslichen Rabiesantigens vom Kaninchen gewonnenes Immunserum liefert im Agarmilieu drei oder mehr Präzipitationsringe gegen das lösliche Tollwutantigen. Negative Kontrollseren erzeugen weniger und schwächere Ringe. In Mäusehyperimmunseren, die reichliche Mengen komplementbindende und neutralisierende Antikörper enthalten, können keine Präzipitine nachgewiesen werden. SHARMA (1958) beschreibt den Agar-Gel-Präzipitationstest nach der Methode von Oudin im Reagenzglas und nach der Technik von Ouchterlony in der Petrischale sowie auf dem Objektträger zur Diagnose der Tollwut. Das Ergebnis der Reaktion konnte bei der Ouchterlony'schen Methode im ersten Fall nach 36 - 48 Stunden, im letzten Fall, bei einem Stanzlöcherabstand von 5 mm, bereits nach 2 Stunden abgelesen werden. SHARMA (1958) stellt fest, daß die Präzipitationsreaktion im Agar-Gel (mit 0,5 % Agar-Agar) für die Diagnose der Tollwut am lebenden und toten Tier von größtem Wert sei. Bei lebenden Tieren dient das Serum verdächtiger Tiere, bei toten Tieren eine 10 - 20 %ige Gehirnsuspension als Unbekannte. FRAS und GRMOVSEK (1958) untersuchen an einem verhältnismäßig kleinen Tollwutmaterial aus der Praxis die Brauchbarkeit der Antigen-Antikörperreaktion in Form der Präzipitation im Agar-Gel, nachdem Vorversuche mit Gehirnen von Virus fixe-infizierten Kaninchen und Mäusen mit 6 und 7 Tagen Inkubationszeit und von Straßenvirus infizierten Kaninchen und Mäusen erfolgreich verlaufen sind. Negativ sind jedoch Untersuchungen mit Virus fixe infizierten Kaninchen, bei denen die Inkubationszeit nur 5 Tage betragen hat. Das Hyperimmunserum stammt vom Pferd, das Antigen wird unverdünnt angesetzt. Die von FRAS und GRMOVSEK (1958) verwendete Technik entspricht der von Mansi. Das Medium besteht aus 15 Gramm Agar-Agar, 16 Gramm NaCl, 15 ccm physiologischer Kochsalzlösung mit 10 %igem Phenolzusatz und 0,03 Gramm Methylorange und wird mit destiliertem Wasser auf 1 000 ccm aufgefüllt; ph-Wert 6,8. Die Präzipitationslinien entstehen bei Virus fixe nach 9 Stunden, bei Straßenvirus nach 24 - 48 Stunden (Zimmertemperatur). Bei Virus fixe kann sich parallel zu der zuerst sichtbar gewordenen Präzipitationslinie nach 48 Stunden eine zweite Linie bilden. Zur Kontrolle benutzen die Autoren die Gehirne gesunder Kaninchen bei Virus fixe- und die Gehirne gesunder Hunde bei Straßenvirusnachweis. Wie FRAS und GRMOVSEK (1958) so bedienen sich auch VILLEMOT und PROVOST (1958) der nach Mansi modifizierten Ouchterlony-Technik. Das Medium ist dem

von FRAS und GRMOVSEK (1958) sehr ähnlich. VILLEMOT und PROVOST (1958) verwenden lediglich statt des Phenols 0,2 ccm Merthiolat auf 1 000 ccm Lösung. Später vermeiden sie auch zur Verminderung der haemolytischen Zone um die Stanzlöcher den Kochsalzzusatz. Wie FRAS und GRMOVSEK (1958) so stanzen auch VILLEMOT und PROVOST zylindrische Löcher von 7 mm Durchmesser in das in eine Petrischale ausgegossene Agarmilieu. Der Lochabstand beträgt bei FRAS und GRMOVSEK (1958) 4 mm, bei VILLEMOT und PROVOST 6 - 7 mm. Das Antigenmaterial besteht aus Gehirnen von natürlicherweise mit Straßenvirus infizierten sowie tollwutverdächtigen Tieren und Menschen. Nach VILLEMOT und PROVOST (1958) soll in die für das Antigen bestimmten Stanzlöcher keine Gehirnsuspension, sondern unverdünntes Gewebe aus den verschiedensten Teilen des Gehirns gebracht werden. Einer der erstrangigsten Faktoren ist nach ihrer Meinung der Gehalt des verwendeten Immunserums an präzipitierenden Antikörpern. Es werden vier verschiedene Seren vom Pferd und vom Esel verwendet. Der Ablauf der Reaktion kann bei Aufbewahrung der Petrischalen im Brutschrank nach 24, 48 und 72 Stunden abgelesen werden, wobei die Serumreservoire zur Ergänzung des Antikörperdepots alle 12 Stunden nachzufüllen sind. Es werden bei Gehirnmaterial von tollwütigen Hunden nach 48 Stunden zwei beinahe gerade Präzipitationsstreifen gefunden, bei den mit Virus fixe infizierten Kaninchengehirnen deren drei, nach 72 Stunden vier Linien, von denen zwei Normalkaninchengehirn-Antigenlinien sind. Eine Suspension von Hühnerembryonen, welche mit avianisiertem Fluryvirus infiziert sind, gibt zwei Präzipitationsbanden, wenn das Material lyophilisiert ist. Zwei Linien bei der Präzipitationsreaktion im Agarmelieu verdeutlichen nach VILLEMOT und PROVOST (1958) das Vorliegen von zwei verschiedenen Komponenten des löslichen Antigens des Tollwutvirus, wie dies bereits von KIPPS, DU, NAUDA, POLSON, SELZER und ENDE (1957) festgestellt wurde. Eine dieser Komponenten ist thermostabil, die andere thermolabil, denn Tollwutmaterial, das 30 Minuten auf 56°C erhitzt wird, ergibt nur eine Präzipitationslinie.

Interessant sind einige Fälle, die VILLEMOT und PROVOST (1958) besonders hervorheben: eine Enzephalitis beim Affen wurde auf Grund des Tierversuches als Tollwut angesprochen. Erst der Serumneutralisationstest bewies, daß das negative Resultat der Präzipitationsreaktion im Agar-Gel richtig war. - Auch in Zersetzung übergegangene tollwutpositive Gehirne liefern noch zwei klare Präzipitationsstreifen. Zwei histologisch negative Fälle waren im Präzipitationstest positiv.

D. Der Nachweis spezifischer Antikörper als Folge einer natürlichen Tollwutinfektion

Bei der Beurteilung dieses Problems erhebt sich die grundsätzliche Frage, ob sich bei einer natürlichen, zum Tode führenden Tollwutinfektion eventuell bereits intravital Antikörper ausbilden können, und ob es Tollwutinfektionen ohne Todesfolge mit Antikörperbildung gibt.

SHARMA (1958) weist bei tollwutverdächtigen Tieren spezifische Antikörper mittels Präzipitationstest im Agarmilieu unter Verwendung von tollwutpositiven Gehirnen oder phenolisierter Tollwutvakzine als Antigen nach. In mehreren Fällen ist der Nachweis jedoch negativ oder er liefert ein falsches positives Ergebnis. Auch ZELL (1913), der das Serum von Straßenvirus infizierten Tieren prüft, erhält schon vor Auftreten klinischer Symptome in der KBR positive Ergebnisse. Auf der anderen Seite gelingt es SCHULTZ, BULLOCK und BREWER (1928) nicht spezifische komplementbindende Antikörper im Serum tollwutkranker Kaninchen nachzuweisen.

MACE und CORTEZ (1949), SCHINDLER und DANNIG (1958) und MARTIN (1959) dient der Nachweis spezifischer virusneutralisierender Antikörper zur Ermittlung der Durchseuchung; insbesondere bei der Fledermaus und bei Vampiren. Aber auch bei streunenden Hunden wird der Test durchgeführt (SADLER und ENRIGHT, 1959). Dabei werden z. T. hohe virusneutralisierende Titer nachgewiesen. Das Vorkommen neutralisierender Antikörper im Serum nicht vakzinierter Tiere kann zweierlei Ursachen haben:

1. Das Tier hat eine stumme Infektion durchgemacht. Daß solche latenten Infektionen vorkommen, bejahen ZUNKER (1953) und PAARMANN (1955). BINDRICH, KUWERT und BECKER (1959) glauben nicht, daß es bei der Tollwut latent infizierte Tiere gibt.

2. Es ist zur Ausheilung der Tollwut bei Individuen gekommen, die schon klinische Symptome gezeigt haben. Über solche Fälle berichten STARR, SELLERS und SUNKERS (1952), KAUKER (1961) und WACHENHOFER (1961).

CHABAND, SERIE und ANDRAE (1955) bedienen sich der Serumelektrophorese zur Diagnose der Tollwut.
Daß die Papierelektrophorese zur Tollwutdiagnose herangezogen werden kann, erscheint jedoch unwahrscheinlich, nachdem KUWERT und OLECHNOWITZ (1960) sowie OLECHNOWITZ und KUWERT (1960) festgestellt haben, daß die immunologisch bedingten Veränderungen in der Globulinkomponente rabizider Hyperimmunseren vorwiegend qualitativer Natur ist.

Eigene Versuche

A. Vorversuche zur Komplementbindungsreaktion

In der überwiegenden Zahl der in der Literatur zur Verfügung stehenden Arbeiten über die KBR bei Tollwut werden die Antigene von Gehirnmaterial künstlich infizierter Versuchstiere hergestellt. Nur wenige Autoren arbeiten mit Gehirnantigenen von natürlich infizierten Tieren. Sieht man von den verschiedenen Konzentrationen der verwendeten Gehirnsuspensionen ab, so gibt es im wesentlichen zwei neuere Methoden der Antigenherstellung:

1. ANDO, ISHII, IRIZAWA, SHIMADA, KATO und MURAHAMI (1953) schließen das antigenhaltige Material im Wasserbad bei 40°C auf und zentrifugieren die Suspension bei 10 000 U./Min. 15 Minuten lang.
2. BINDRICH und KUWERT (1957) frieren das Antigen 12 Stunden bei -20°C ein, tauen es dann auf und zentrifugieren bei 3 000 U./Min. 45 Minuten lang.

BULLING (1957) bedient sich beider Methoden und findet, daß sie gleichwertig sind.

In der vorliegenden Arbeit wird zur Herstellung eines für die KBR geeigneten Antigens zunächst die technisch einfachere Methode nach BINDRICH und KUWERT (1957) gewählt. Zur Verfügung steht auch das von BINDRICH und KUWERT (1957) hergestellte und in ihren Untersuchungen verwendete Hyperimmunserum vom Hund. Dieses Serum fällt in seiner Eignung für die KBR trotz der angegebenen Haltbarkeitsdauer von zwei Jahren und trotz Aufbewahrung bei +4°C sowie -20°C schnell ab und liefert nur etwa drei Monate zufriedenstellende Ergebnisse. Das Gleiche kann auch bei einer weiteren Lieferung beobachtet werden. In der KBR mit Gehirnantigen natürlich infizierter Tiere häufen sich zunächst die unspezifischen Ergebnisse. Um eventuell störende Einflüsse auf die Spezifität der KBR von seiten des Antigens möglichst einzuengen, wird dieses in Anlehnung an die Methode von ANDO, ISHII, IRIZAWA, SHIMADA, KATO und MURAHAMI (1953) sowie BULLING (1957) bei 16 - 18 000 U./Min. unter Kühlhaltung bei 0°C 20 Minuten lang zentrifugiert. So entsteht ein klares Antigen, in dem korpuskuläre Elemente nicht mehr störend wirken können. Zu diesem Zeitpunkt ist das Riemser Serum bereits nicht mehr für die KBR geeignet. Das neu eingesetzte Antitollwutserum vom Institut Pasteur in Paris liefert zufriedenstellende Ergebnisse.

Mit Hilfe einer modifizierten Antigenbereitung nach BINDRICH und KUWERT (1957) sowie BULLING (1957) und dem Antirabiesserum vom Institut Pasteur wird die Mehrzahl der Untersuchungen durchgeführt.

B. Vorversuche zur Präzipitation im Agarmilieu

Das Gehirnmaterial wird vorwiegend aus Hirnstamm und Thalamus entnommen und vor dem Ansetzen des Versuches wenigstens 12 Stunden bei -20°C eingefroren. Die Reaktion läuft bei Zimmertemperatur (nach FRAS und GRMOVSEK, 1958) ab. Versuche, die Präzipitation nach VILLEMOT und PROVOST (1958) bei Brutschranktemperatur durchzuführen, schlagen fehl, da es schnell zur Ausbildung eines milchigweißen Hofes um das Antigendepot kommt, in dessen Bereich spezifische Präzipitationsbanden nicht nachgewiesen werden können.

Der anfänglich nach VILLEMOT und PROVOST (1958) verwendete Zusatz von Methylorange zum Agar-Gel erweist sich als nicht vorteilhaft für das Ablesen der Präzipitationsreaktion und wird deshalb nicht mehr vorgenommen.

Die Konsistenz des Agarmilieus schwankt je nach Kontrollnummer des verwendeten Agar-Agar, sodaß jede Charge neu ausgewertet werden muß, um eine zu feste Konsistenz des Agar-Gel zu vermeiden. Diese ist für die Zeitdauer bis zum ersten Auftreten der Präzipitationslinien von ausschlaggebender Bedeutung. Ein in seiner Konsistenz zu festes Agarmilieu verzögert das Auftreten der Banden um 24 - 72 Stunden. Außerdem werden die Streifen kürzer und zarter und können durch die lange Dauer der Ausbildung von unspezifischen Reaktionen (milchigtrübe Hofbildung) überdeckt werden. Es wird besonderer Wert auf eine möglichst weiche Konsistenz des Agarmilieus gelegt und versucht sie so einzustellen, daß das Ausstanzen der Löcher gerade noch möglich ist.

Außerordentlich wichtig ist auch der ph-Wert des Mediums, der möglichst bei ph 6,8 - 7,2 gehalten wird. Ein zu saures oder zu alkalisches Milieu unterbindet jede serologische Reaktion zum Nachweis der Tollwut im Agar-Gel.

Im Laufe der Untersuchungen hat es sich als zweckmäßig erwiesen, jedes Antigen gegen zwei verschiedene Seren auszuwerten. Folgende Seren werden auf ihre Brauchbarkeit bei der Präzipitation im Agar-Gel geprüft:

1. Rabizides Hyperimmunserum vom Hund von der Forschungsanstalt für Tierseuchen auf der Insel Riems.
2. Antitollwutserum vom Pferd, konzentriert, der Firma Lederle Detroit/ USA.
3. Serum Anti-Flury (Farcha) vom Esel nach VILLEMOT und PROVOST (1958).
4. Serum antirabique vom Pferd vom Pasteur Institut in Paris.
5. Siero antirabbico vom Pferd vom Institut Sclavo, Siena, Italien.

Das rabizide Hyperimmunserum vom Hund ist trotz Verwendungsmöglichkeit bei der KBR im nativen Zustand nicht in der Lage, eine nachweisbare Präzipitation im Agar-Gel gegen positives Tollwutantigen

zu liefern. Es wird daher versucht, die eventuell vorhandenen präzipitierenden Antikörper durch Ausfällung der Globuline mit Ammoniumsulfat, entsprechend der Erfahrung von WOERNLE bei der Diagnose verschiedener anderer Viruskrankheiten, anzureichern. Im positiven Falle liefert das angereicherte Riemser Immunserum nunmehr eine in der Mitte zwischen Antigen- und Serumreservoir verlaufende, deutlich erkennbare gerade weiße Präzipitationslinie. Das Lederle-Serum führt bei positiver Reaktion zu zwei parallel verlaufenden geraden Linien in der Mitte zwischen den Stanzlöchern mit dem Antigen und dem Serum. Das italienische und das französische Antitollwutserum sind auch nach Anreicherung in der Präzipitation ungeeignet und liefern entweder unspezifische oder negative Ergebnisse. Gut brauchbar ist das von Villemot zur Verfügung gestellte Serum Anti-Flury. Allerdings ist es nur begrenzt haltbar. Dieses Serum wird in der Hauptsache zusammen mit dem Lederle-Serum bei den weiteren Untersuchungen verwendet.

Beim Ablesen der Präzipitation im Agar-Gel ist besonders nach 24 und 36 Stunden auf das Vorhandensein von Banden zu achten. Können die Streifen innerhalb dieser Zeit nicht festgestellt werden, so werden sie später entweder durch eine starke milchigtrübe Hofbildung um das Antigen herum oder durch die Ausbildung unspezifischer Reaktionen überdeckt und unsichtbar.

Hauptversuche

I. Versuchsreihe

1. Ziel und Material

Zweck der Versuche ist es, vergleichend die KBR und die Präzipitation im Agar-Gel bei der Routinediagnostik der Tollwut zu erproben. Dabei stehen die Ergebnisse der pathologisch-histologischen Untersuchung in 434 Fällen und die des Tierversuches in 106 Fällen zum Vergleich mit den Ergebnissen von 450 Komplementbindungs- und Präzipitationsreaktionen zur Verfügung. Den Versuchen haftet jedoch der Mangel an, daß nicht in jedem Fall der Tierversuch durchgeführt werden konnte. Als "punctum fixum" der Diagnose dient deshalb zum größten Teil das Ergebnis der pathologisch-histologischen Untersuchung des Ammonshornes.

Verwendung finden 450 Gehirne der Spezies Hund, Katze, Reh, Fuchs, Dachs, Marder, Wiesel, Iltis, Hase, Eichhörnchen, Igel, Ratte, Maus, Meerschweinchen, Rind, Habicht und Amsel, die unter Tollwutverdacht eingesendet wurden, sowie die Gehirne von Mäusen und Kaninchen, die i.c. mit verschiedenen Virusstämmen infiziert wurden.

2. Methodik

Komplementbindungsreaktion. Ein Gramm eingefrorenes Gehirnmaterial (vorwiegend aus Thalamus und Hirnstamm) wird in ein Zentrifugenröhrchen nach Zusatz von fünf Teilen physiologischer Kochsalzlösung durch Schütteln mit Glasperlen zu einer möglichst gleichmäßigen 16,6 %igen Suspension verarbeitet und diese Suspension wenigstens 12 Stunden bei -20°C eingefroren. Das Auftauen erfolgt bei Zimmertemperatur. Dann wird die Suspension 20 Minuten bei 3000 U./Min. und der vorsichtig abgesaugte Überstand 20 Minuten bei 16 - 18 000 U./Min. und 0°C zentrifugiert. Die nun völlig klare Flüssigkeit kann abgegossen werden und dient als Antigen.

Als Serum findet das Serum antirabique vom Pasteur Institut Paris mit einem Titer von 1:32 Verwendung. Bei Durchführung der KBR wird das Antigen unverdünnt, sowie in den Verdünnungen 1:2 und 1:4 angesetzt. Das Serum wird 30 Minuten bei 58°C inaktiviert. Konserviertes Mischserum gesunder Meerschweinchen dient als Komplement. Die KBR wird mit zwei Einheiten des Komplements durchgeführt. Im haemolytischen System findet eine 2,5 - 3 %ige Schaferythrozytenaufschwemmung Anwendung.

Die Verdünnung wird mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Nach Durchführung der üblichen Vorversuche wird im Hauptversuch mit 0,2 ccm Dosen gearbeitet. Die Bindungszeit beträgt 20 Minuten bei 37°C. Nach Zusatz des haemolytischen Systems verbleibt das Serum-Antigen-Komplementgemisch weitere 30 Minuten im Wasserbad. Eine Antigenkontrolle ohne Serum und eine Serumkontrolle ohne Antigen sowie ein bekanntes positives Antigen werden bei jeder KBR mitgeführt. Das als positiv bekannte Antigen stammt von Gehirnmaterial künstlich infizierter Kaninchen.

Die KBR wird dann als positiv gewertet, wenn die Blutkörperchen im unverdünnten Antigen vollkommen ungelöst und bis zu etwa 3/4 gelöst sind. (++++, +++, ++, +) Wenn sich die Erythrozyten zu mehr als 3/4 gelöst haben (±) gilt die Reaktion als negativ.

Präzipitation im Agarmilieu. Das Medium besteht aus 5 Gramm Agar-Agar pulverisatum (Merck), 450 ccm einer 8 %igen Kochsalzlösung und 25 ccm einer 10 %igen Lösung von Phenolum liquidum und hat einen ph-Wert von 6,8 - 7,2.

15 ccm des Mediums werden in "Alumbra"-Schalen gegossen, sodaß der Boden der Petrischale ca 4 - 5 mm hoch mit Agar bedeckt ist. Er muß nach dem Erstarren klar und durchsichtig sein. Mit einem Stahlrohr von 7 mm lichtem Durchmesser werden Löcher in das Agarmilieu gestanzt. Die Anordnung der Löcher zueinander variiert je nach der Zahl der zu untersuchenden Proben. Als optimaler Abstand zwischen Antigen- und Antikörperreservoir erweisen sich 6 - 7 mm. Wird der Abstand zu eng gewählt, dann bildet sich der Präzipitationsstreifen entweder im Bereich eines milchig-trüben Hofes, der bei zersetztem Gehirnmaterial um das Antigendepot herum zu erwarten ist, aus, oder das Präzipitationsband wird so kräftig und aufgelockert, daß es

mit anderen unspezifischen Reaktionen verwechselt werden kann. Bei zu großem Abstand zwischen den Stanzlöchern mit dem Antigen und dem Serum wird der Präzipitationsstreifen im positiven Fall zarter und kürzer, tritt später auf und kann eventuell überhaupt nicht zur Ausbildung kommen. Jedes der Stanzlöcher wird mit einem Tropfen Agar am Boden der Schale abgedichtet.

Das Antigenmaterial stammt vorwiegend aus Hirnstamm und Thalamus und wird wenigstens 12 Stunden eingefroren. Nach Auftauen wird das Gehirnmaterial, das den vollvirulenten Erreger enthält, ohne Flüssigkeitszusatz zu einem homogenen Brei verarbeitet und in die Stanzlöcher eingefüllt.

Folgende Seren finden Anwendung:

1. Rabizides Hyperimmunserum vom Hund von der Forschungsanstalt für Tierseuchen auf der Insel Riems, bei dem durch Ausfällung mit Ammoniumsulfat die spezifischen Antikörper angereichert werden.
2. Antitollwutserum vom Pferd, konzentriert, der Firma Lederle, Detroit /USA.
3. Serum Anti-Flury (Farcha) vom Esel nach Villemot und Provost.

Jeweils zwei dieser Seren werden gegen das zu untersuchende Gehirnmaterial angesetzt. Zur Kontrolle der Wirksamkeit des präzipitierenden Serums empfiehlt es sich ein positives, präzipitogenhaltiges Antigen mitzuführen.

Das Ablesen der Reaktion erfolgt nach 18 - 24 und nach 36 - 48 Stunden Aufbewahrung bei Zimmertemperatur gegen einen dunklen Hintergrund bei seitlich einfallendem Licht oder mit einem nach der Beschreibung von VILLEMOT und PROVOST (1958) hergestellten Beleuchtungssystem.

Für die histopathologische Untersuchung wird Material aus beiden Ammonshörnern entnommen. Die Färbung der ca 4μ starken Paraffinschnitte erfolgt nach PAARMANN (1954) mit Rhodamin B. Die Präparate werden zuerst auf das Vorliegen encephalitischer Veränderungen, wie perivasculäre lymphozytäre Infiltrate, Gliazellmobilisation usw. geprüft und dann mit dem starken Trockensystem systematisch nach Art der Auszählung eines Blutausstriches auf das Vorhandensein von Negrikörperchen durchmustert.

Pro Tierversuch werden in der Regel 5 weiße Mäuse verwendet. Die Tiere stammen aus der virusfreien Mäusezucht der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen. Aus den zu prüfenden Gehirnen werden Teile des Ammonshornes und des Hirnstammes entnommen und daraus mit physiologischer Kochsalzlösung eine 10 %ige Suspension hergestellt. Zur Hemmung der Begleitbakterien werden pro ml Suspension 500 i.E. Penicillin und 1 mgr Streptomycin zugesetzt. Das Aufschließen der Gehirnsuspension erfolgt durch Eingefrieren bei -20^{o}C und anschließendem Auftauen bei Zimmertemperatur. Nach vorsichtigem Abzentrifugieren der groben Teile wird

die überstehende Flüssigkeit zur Injektion verwendet. Es werden unter Aethernarkose jeder Maus 0,03 ccm Suspension i.c. gegeben. Die Versuchstiere werden 4 Wochen lang beobachtet. Beim Vorliegen von Tollwut verenden die Tiere in der Regel zwischen dem 11. und 14. Tag post infectionem. Nach dem Tode der Tiere wird das Gehirn entnommen, in toto in Paraffin eingebettet und die daraus hergestellten histologischen Schnitte nach PAARMANN (1954) gefärbt. Der Tierversuch wird dann als positiv gewertet, wenn Negrikörperchen nachgewiesen werden können.

3. Versuchsergebnisse

Im Rahmen der Untersuchungen werden insgesamt 106 Tierversuche durchgeführt. Sie liefern neben der pathologisch-histologischen Untersuchung eine weitere Vergleichsmöglichkeit für die Präzipitationsreaktion im Agarmilieu sowie die KBR und dienen z.T. als alleinige Kontrolle in den Fällen von Tollwutverdacht, bei denen eine histologische Untersuchung nicht mehr möglich ist, so z.B. bei starker Zersetzung des Gehirns oder bei seiner Zerstörung durch traumatische Insulte. Aus 3 solchen Gehirnen gelingt es, das Tollwutvirus durch den Tierversuch nachzuweisen. KBR und Präzipitation sind in diesen Fällen positiv (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 gibt jene Versuche wieder, bei denen die Ergebnisse der klassischen Untersuchungsmethoden, des Tierversuches und der pathologisch-histologischen Untersuchung des Ammonshornes zum Vergleich zur Verfügung standen. Die Tabelle zeigt, daß alle Untersuchungsergebnisse in 13 positiven und 45 negativen Fällen übereinstimmen, d.h. insgesamt 58 mal. Bei 48 Untersuchungen stimmt das Ergebnis der verschiedenen Untersuchungsmethoden nicht überein.

Anhand des vorliegenden Materials kann auch die Sicherheit des Nachweises von Negrikörperchen und des Tierversuches geprüft werden. In 19 von 106 Untersuchungen stimmt der pathologisch-histologische Befund mit dem Tierversuch nicht überein. Entweder ist das Ergebnis der histologischen Untersuchung zweifelhaft (Polioencephalitis non purulenta in Form von Ganglienzelldegeneration, Gliamobilisation und lymphozytäre perivaskuläre Infiltration) oder positiv (Nachweis von Negrikörperchen neben dem oben angegebenen veränderten Bild), der Tierversuch aber negativ (9 mal), oder der histologische Nachweis der Tollwut ist negativ bzw. zweifelhaft und der Tierversuch positiv (10 mal).

Von den 19 Fällen müssen drei gesondert betrachtet werden. In diesen drei Fällen stammen die zu untersuchenden Tiere aus einem Tollwutgebiet und Vorbericht sowie Zerlegungsbefund sprechen für das Vorliegen von Tollwut. Der Nachweis von Negrikörperchen kann erbracht werden und eine oder beide serologische Untersuchungsmethoden sprechen für das Vorliegen von Tollwut. Offensichtlich hat hier der Tierversuch versagt.

Tabelle 1

Vergleich der Ergebnisse von Tierversuchen, path. -hist. Untersuchungen, Präzipitation und KBR

Zahl der Fälle	Tierversuch	path. -hist. Untersuchung	Präzipitationsreaktion	KBR	Bemerkung
13	+	+	+	+	übereinstimmende Ergebnisse
45	-	-	-	-	
58					
1	+	+	+	+	nicht übereinstimmende Ergebnisse
3	+	-	+	-	
1	+	+	-	+	
4	+	-	+	+	
3	+	-	+	-	
1	+	-	-	+	
1	+	-	-	-	
3	+	nicht durchgeführt	+	+	
1	-	+	+	+	
2	-	-	+	+	
1	-	+	+	-	
2	-	+	-	+	
3	-	+	-	-	
2	-	+	-	-	
17	-	-	+	-	
1	-	-	+	-	
1	-	-	-	+	
1	-	nicht durchgeführt	-	-	
48					
+58					

Tabelle 2

Vergleich der Ergebnisse der path. -hist. Untersuchungen, Präzipitation und KBR

Zahl der Fälle	Path. -hist. Untersuchung	Präzipitations-reaktion	KBR	Bemerkungen
13	+	+	+	übereinst.
275	-	-	-	Ergebnis
288				
4	+	+	-	
2	+	-	+	
1	nicht durch-geführt	+	+	
10	"	-	-	nicht über-einstimmende Ergebnisse
3	±	-	-	
4	+	-	-	
7	-	±	-	
1	nicht durch-geführt	-	+	
24	-	-	+	
66				

Legt man die 16 Versager in der pathologisch-histologischen Untersuchung des Ammonhornes zugrunde, so erhält man eine Sicherheit im Nachweis von Negrikörperchen von 85 %, d. h. eine Zahl wie man sie in der Literatur als Durchschnitt finden kann.

Serodiagnostische Untersuchungen, bei denen allein die pathologisch-histologische Untersuchung des Ammonshornes zur Kontrolle dienen konnte, sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Die drei Methoden, pathologisch-histologische Untersuchung, Präzipation und KBR stimmen in 13 positiven und 275 negativen, also insgesamt in 288 Fällen, überein. 66 mal besteht zwischen den Ergebnissen der einzelnen Techniken eine Diskrepanz, die noch dadurch verstärkt wird, daß 12 mal die pathologisch-histologische Untersuchung des Ammonshornes nicht möglich ist und in 3 Fällen die histopathologische Untersuchung ein zweifelhaftes Ergebnis liefert. Das bedeutet also, daß ein Vergleich mit den Ergebnissen der Präzipitation und der KBR in 15 Fällen nicht möglich ist.

Tabelle 3

Vergleich der Ergebnisse in der Präzipitationsreaktion mit dem Ergebnis der klassischen Untersuchungsmethoden

Zahl der Fälle	Präzipitation	Klassische Tollwutdiagnose (path.-hist. Untersuchung und/oder Tierversuch)
11	+	+
17	+	-
28		
8	+ -	-
36		
13	-	+

Als einzige serologische Methode ist die Präzipitationsreaktion 28 mal positiv und 8 mal zweifelhaft (Tabelle 3). In 11 von 36 Fällen kann die Diagnose durch die klassischen Untersuchungsmethoden (pathologisch-histologische Untersuchung des Hyppocampus und/oder Tierversuch) bestätigt werden; 17 mal ist das positive Ergebnis der Präzipitation weder durch den Nachweis von Negrikörperchen noch durch den Tierversuch zu untermauern. Den 8 zweifelhaften Ergebnissen stehen 8 negative Kontrollen gegenüber. In 13 Fällen, in denen eine oder beide Kontrollen positiv sind, zeigt sich die Präzipitation als negativ.

Tabelle 4

Vergleich der Ergebnisse in der KBR
mit dem Ergebnis der klassischen Untersuchungsmethoden

Zahl der Fälle	KBR	Klassische Tollwutdiagnose (path.-hist. Untersuchung und/oder Tierversuch
6	+	+
25	+	-
1	+	nicht durchgeführt
32		
18	-	+

Die KBR allein liefert 32 mal ein positives Ergebnis, das 6 mal durch eine oder beide Kontrollen bestätigt werden kann. (Tabelle 4) 25 mal ergibt die Kontrolle beim Vorliegen einer positiven KBR ein negatives Ergebnis. Einmal ist bei positiven Resultat in der KBR keine der beiden Kontrollen durchgeführt worden. Auf der anderen Seite ist die KBR in 18 Fällen beim Nachweis von Negrikörperchen oder bei einem positiven Tierversuch negativ.

Insgesamt stimmen die KBR und die Präzipitationsreaktion im Agarmedium in 382 Fällen, in 38 tollwutpositiven und in 344 tollwutnegativen Untersuchungsergebnissen überein. In 35 tollwutpositiven und in 321 tollwutnegativen Fällen decken sich die Ergebnisse der serologischen Techniken und die der klassischen. 2 mal ist die Präzipitationsreaktion und die KBR positiv, die Kontrolle jedoch negativ.

Andererseits ist bei einem negativen Resultat in beiden serologischen Untersuchungsmethoden die klassische Tollwutdiagnose 7 mal positiv und 6 mal zweifelhaft. 11 mal ist eine Kontrolle der beiden serologischen Methoden durch die histologische Untersuchung des Ammonshornes oder durch den Tierversuch nicht möglich.

Tabelle 5

Vergleich der übereinstimmenden Ergebnisse in der Präzipitationsreaktion mit den Ergebnissen der klassischen Untersuchungsmethoden

Zahl der Fälle	Präzipitation	KBR	Klassische Tollwutdiagnose (path.-hist. Untersuchung und/oder Tierversuch)
35	+	+	+
2	+	+	-
1	+	+	nicht durchgeführt
38			
7	-	-	+
6	-	-	+ -
321	-	-	-
10	-	-	nicht durchgeführt
344			
+38			
382			

4. a) Besprechung der Ergebnisse in der KBR

Mit Ausnahme der Ergebnisse der aus Tierversuchen stammenden Gehirne können die mit natürlich tollwutinfizierten Material gemachten Erfahrungen der letzten Jahre nicht in vollem Umfang bestätigt werden. Es gibt eine ganze Reihe von positiven Ergebnissen, die weder durch eine andere Untersuchungsmethode (Nachweis von Negrikörperchen, Tierversuch) noch durch den Vorbericht oder den Zerlegungsbefund gestützt werden können. LINSERT, TEMPLIN und WOLTER (1959) versuchen die gegenüber der histologischen Untersuchung häufigeren positiven Ergebnisse in der KBR damit zu erklären, daß ein solches Verhältnis von Versagern bei histologischen Untersuchungen üblich sei. Der geringe Prozentsatz an Mehrausbeute durch den Tierversuch bei histologisch negativen Untersuchungsmaterial dürfte dieser Feststellung entgegenstehen. Ebenfalls nicht bestätigt werden kann die Ansicht BULLINGS (1957), die KBR sei dem Tierversuch überlegen. Im übrigen darf in diesem Zusammenhang auf UEKI, KATO, OISHI, MURAKAMI und SHIMADA (1957) verwiesen werden, die feststellen, daß bei experimentell mit Tollwut infizierten Mäusen zuerst das Virus, dann das lösliche Antigen und schließlich die Negri'schen Körperchen nachweisbar sind. Es müßte also - gleiche Wirksamkeit

von Tierversuch, serologischer Methode und histo-pathologischer Untersuchungstechnik vorausgesetzt - die meisten Fälle von Tollwutinfektion durch den Tierversuch und die wenigsten durch die histologische Untersuchung erfaßt werden; dazwischen stünde die serologische Methode.

Die unspezifische Bindung des Komplements dürfte wohl in erster Linie auf das Gehirnmaterial als Antigen zurückzuführen sein. Um den Einfluß korpuskulärer Elemente auszuschalten, werden die Gehirnsuspensionen durch hochtouriges Zentrifugieren weitgehend geklärt. Ferner wird in 30 Versuchen mit Antigenen, die das Komplement unspezifisch binden, versucht, in Anlehnung an ANDO, ISHII, IRIZAWA, SHIMADA, KATO und MURAHAMI (1953) durch 50 %igen Zusatz von inaktivierten Serum (Boviserin) zum Suspensionsmittel zu verläßlicheren Ergebnissen in der KBR zu kommen. Eine Verbesserung konnte jedoch auch dadurch nicht erzielt werden. Es kann also die Annahme von ANDO, ISHII, IRIZAWA, SHIMADA. KATO und MURAHAMI (1953) nicht bestätigt werden, wonach ein Mangel an Proteinen sich störend auf den Ablauf und Ausfall der KBR auswirkt. Wahrscheinlich sind es die sogenannten Pseudoantigene (TAKENOMATA, 1924), welche zu falschen positiven Ergebnissen führen. Vielleicht sind es auch diese "Pseudoantigene" welche TAGUCHI, MOTO, TAKEHARA und URIN (1957) zu der Feststellung veranlassen, je länger die Gehirne aufbewahrt werden, desto höher sei ihr Titer in der KBR. Daß die vollständige Zersetzung der Gehirne eine spezifische KBR unmöglich macht, darüber sind sich die meisten Autoren einig. Aber nicht nur in Lösung gegangene Zersetzungsprodukte des Gehirns wirken antikomplementär, vielmehr dürften dabei auch Bakteriensubstanzen (siehe II. Versuchsreihe) und das Haemoglobin eine Rolle spielen. Letzteres kann mitunter allein durch seine Farbe die Beurteilung des Haemolysegrades in der KBR erschweren (RICE, 1960).

Abgesehen von diesen Fehlerquellen scheint sich bei den vorliegenden Untersuchungen das Ergebnis von DEPOUX und MERVEILLE (1954) zu bestätigen, die zu folgendem Schluß kommen: wenn die KBR positiv ist liegt in 2/3 der Fälle Tollwut vor, in 1/3 der Fälle nicht. In die gleiche Richtung geht zweifellos die Feststellung von CAPPONI und SUREAU (1955), die Ergebnisse der KBR seien manchmal schwierig zu deuten.

Die Ursache für das Versagen der KBR beim Vorliegen von Tollwut ist in einem zu niedrigen Virustiter zu suchen (FALKE und UHLMANN, 1957; UEKI, KATO, OISHI, MURAKAMI und SHIMADA, 1957; SCHINDLER, 1957).

Die Möglichkeit, daß beim Fehlen tollwutspezifischer Antigene im Gehirngewebe falsche positive Ergebnisse in der KBR durch anderweitige Antigen-Antigenkörperreaktionen bedingt sein können, d. h. daß im Tollwutimmunserum auch nichttollwutspezifische Antikörper vorhanden sein könnten, die mit einem zufällig im Gehirnmaterial vorhandenen spezifischen Antigen reagieren, ist noch ungeklärt, sollte aber in Erwägung gezogen werden.

Daß die KBR eine spezifische Reaktion zum Nachweis der Tollwut sein kann, beweisen 12 Versuche mit dem Gehirnmaterial i.c. infizierter Mäuse und das vom Kaninchen durch i.c. Infektion gewonnene Antigen welches bei allen Versuchen in der KBR als Kontrolle mitläuft. Dabei dient in jedem Fall ein anderer Virusstamm als Ausgangsmaterial.

4. b) Besprechung der Ergebnisse in der Präzipitation im Agarmilieu

Die von den verschiedenen Autoren nachgewiesene hervorragende Sicherheit der Präzipitation im Agar-Gel kann nicht in vollem Umfang bestätigt werden. Es wird fast der gleiche Prozentsatz von Fehlergebnissen ermittelt wie bei der KBR, trotzdem durch Eingefrieren des Gehirnmaterials versucht wird, die Zellen zu sprengen und eine größere Menge des Präzipitinogens freizusetzen. Abgesehen von dem Versuch VILLEMOTS (1960) das Antigen durch die Einwirkung von Trypsin auf das Gehirngewebe freizusetzen, erwähnen die diesbezüglichen Arbeiten keine Vorbehandlung des Gehirnmaterials. Das Aufschließen der Antigene ist jedoch in der KBR durch Eingefrieren und Auftauen üblich und wird deshalb auf die Präzipitation übertragen.

Es finden sich in den Arbeiten von VILLEMOT und PROVOST (1958), FRAS und GRMOVSEK (1958) und SHARMA (1958) keine Hinweise auf einen besonderen Entnahmeort für das zur Untersuchung verwendete Gehirnmaterial. Es kann jedoch beobachtet werden, daß nicht alle Gehirnteile die gleiche Menge Präzipitinogens enthalten. Es ist in der weißen Substanz und im Ammonshorn in geringerem Grade oder garnicht nachweisbar, während es im Thalamus und im Material aus dem Gehirnstamm im allgemeinen so stark vertreten ist, daß es zu deutlichen Präzipitationsbanden führt. Diese Feststellung deckt sich mit dem Ergebnis der Untersuchungen von BINDRICH, POTEL und KUWERT (1958) über den Nachweis komplementbindender Antigene in den verschiedenen Gehirnteilen. In beiden Fällen handelt es sich um lösliches Antigen; ob sie identisch sind ist nicht bekannt.

Als mögliche Fehlerquellen für das Versagen der Präzipitationsreaktion können angeführt werden:

1. Ein präzipitierendes Serum, das unspezifische Antigen-Antikörperreaktionen liefert, d.h. ein Serum, das auf Grund der Immunisierungsmethode präzipitierende Antikörper gegen Fremdeiweiß oder Gehirngewebe enthält, oder ein Tollwutimmunserum, das auch nichttollwutspezifische Antikörper enthält, die mit einem zufällig im Gehirnmaterial vorhandenen anderen spezifischen Antigen präzipitieren.
2. Ein für die Präzipitation ungeeignetes rabizides Immunserum, das zu wenig oder keine präzipitierenden Tollwutantikörper enthält.

3. Stark blutdurchtränktes Gehirngewebe bei dem es zu mehr oder weniger stark ausgeprägten Serum-Serumpräzipitationslinien kommen kann.

4. Stark zersetztes Gehirnmaterial. In solchen Fällen bilden sich um die Stanzlöcher mit dem Antigen milchigtrübe Höfe früher als normalerweise aus und verhindern das Ablesen der Präzipitationsbanden innerhalb dieser Höfe.

5. Es kommen bei der Präzipitationsreaktion nicht genügend Präzipitinogene zur Ausfällung (FEINBERG, 1958; LANG und SCHWICK, 1955) oder das Antigen enthält zu wenig Präzipitinogene. Das kann bei Versuchen beobachtet werden, welche mit experimentell infizierten Mäuse- und Kaninchengehirnen durchgeführt werden. Bei den Mäusegehirnen kann in keinem Fall, bei den Kaninchen nur dann eine Präzipitationsreaktion nachgewiesen werden, wenn die Inkubationszeit mehr als 18 Tage beträgt. Demnach erreicht das im Geltest nachweisbare Präzipitinogen erst während des Ablaufes der Tollwutinfektion die zur Präzipitation erforderliche Konzentration als das in der KBR nachweisbare lösliche Antigen. Damit ist auch die Möglichkeit ausgeschlossen, mit Hilfe der Präzipitationsreaktion den Tierversuch durch Nachweis von Präzipitinogenen im Gehirn frühzeitig getöteter Tiere zu einem schnellerem Abschluß zu bringen.

II. Versuchsreihe

1. Ziel und Material

Um Einblick in die Verbreitung der Tollwut bei Wildtieren zu erhalten, werden aus dem Einzugsgebiet einer Tierkörperbeseitigungsanstalt (TKBA) das im Regierungsbezirk Nord-Württemberg am stärksten von der Tollwut betroffen ist, Gehirne von 727 Füchsen und 36 Dachsen serologisch untersucht. Die Tierkörper werden bei der TKBA zwecks Erlangung der vom Land Baden-Württemberg gewährten Fang- und Abschlußprämien abgeliefert. Durch einen Angestellten der TKBA wird nach Spaltung des Schädels jeweils mittels eines neuen Holzspatels Gehirnmaterial in ein Plastikgefäß verbracht und bis zur Abholung nach etwa 10 Tagen im Kühlschrank bei $+5^{o}C$ aufbewahrt. Später werden statt des Gehirnmaterials die Köpfe einer kleineren Anzahl von Wildtieren an das Untersuchungsamt gebracht und erst dort die Gehirne entnommen.

2. Methodik

Wie bei der I. Versuchsreihe

3. Versuchsergebnisse

Die erste orientierende Untersuchung an dem von der TKBA entnommenen Gehirnmaterial findet durch die Präzipitationsreaktion im Agarmilieu statt. Der Tierversuch wird dann angesetzt, wenn die Gehirne eine positive oder zweifelhafte Reaktion im Agar-Gel liefern. Um die Sicherheit des Tierversuches zu erhöhen, finden je Versuch 10 - 15 Mäuse Verwendung. Auf diese Weise werden 23 Tierversuche durchgeführt. Drei davon verlaufen positiv. In jedem dieser Versuche verenden eine oder mehrere Mäuse innerhalb der für die Tollwut typischen Inkubationszeit von 10 - 15 Tagen nach der i.c. Inokulation und es können bei der pathologisch-histologischen Untersuchung des Ammonshornes dieser Tiere Negrikörperchen nachgewiesen werden. Das Ergebnis der KBR ist nicht verwertbar: von 641 Untersuchungen sind 227 positiv.

Tabelle 6

Zusammengefaßte Übersicht der Untersuchungsergebnisse der in der TKBA entnommenen Gehirne

Zahl der Fälle	Tierversuch	Präzipitation	KBR
20	-	+	+
3	+	+	+
204 / 227	nicht durchgeführt	-	+
414 / 641	nicht durchgeführt	-	-

Die Entnahme der Gehirne im Untersuchungsamt (es sind die Gehirne von 121 Füchsen und einem Dachs) bringt zwei Vorteile mit sich:

1. Die Gehirne werden nicht zertrümmert und es ist möglich, bei zweifelhaften oder positiven serologischen Untersuchungsergebnissen neben dem Tierversuch die pathologisch-histologische Untersuchung zur Kontrolle hinzuzuziehen.
2. Die KBR liefert nicht mehr wie im Falle der Entnahme des Gehirnmaterials in der TKBA eine große Zahl unspezifischer Reaktionen.

Von diesen Gehirnen sind zwei in der Präzipitation positiv und vier zweifelhaft. Die Kontrolle durch die histologische Untersuchung des Ammonshornes ist dreimal zweifelhaft (Ganglienzelldegeneration, Gliazellmobilisation und Pseudoneuronophagie, jedoch keine Negrikörperchen) und dreimal negativ. Der Tierversuch wird sechsmal angesetzt und es gelingt das Tollwutvirus in einem Fall, bei dem die Präzipitation positiv gewesen ist, nachzuweisen. Die KBR zeigt einmal Übereinstimmung mit der Präzipitation und dem Tierversuch, sowie mit der histologischen Untersuchung, die ein zweifelhaftes Ergebnis gezeigt hat. Dreimal kommt es zu wahrscheinlich falschen positiven Ergebnissen in der KBR.

Tabelle 7

Zusammengefaßte Übersicht der Untersuchungsergebnisse der im Untersuchungsamt entnommenen Gehirne

Zahl der Fälle	Tierversuch	path.-hist. Untersuchung	Präzipitat.	KBR
1	+	+/-	+	+
1	-	+/-	+	-
1	-	+/-	+/-	-
3	-	-	+/-	-
3	nicht durchgeführt		-	+
112	nicht durchgeführt		-	-
121				

4. Besprechung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der II. Versuchsreihe sind zweifellos sehr lückenhaft. Es fehlt an einer geeigneten Kontrolle, die parallel zu allen Versuchen läuft. Dennoch gelingt es in vier Fällen einer positiven Präzipitationsreaktion die Tollwutinfektion mit dem Tierversuch nachzuweisen.

Die Ursache für das Versagen der KBR im ersten Versuchsabschnitt liegt wohl in der fortgeschrittenen Zersetzung des Gehirnmaterials während der warmen Jahreszeit, z. T. bedingt durch die lange Zeit zwischen Erlegung der Tiere und Entnahme des Gehirnmaterials, z. T. aber auch durch die längere Aufbewahrung des bei der Entnahme verunreinigten Gehirnmaterials im Kühlschrank der TKBA. In den Wintermonaten hatte das eingekommene Gehirnmaterial zum größten Teil ein frischeres Aussehen. Trotzdem bleiben die unspezifischen Reaktionen weiterhin bestehen. Vergleichsweise werden deshalb das Gehirnmaterial der ersten Art und die im Untersuchungsamt entnommenen Gehirne bakteriologisch untersucht. Während letztere Gehirn-

suspensionen nur einzelne Keime enthalten ist der Keimgehalt ersterer außerordentlich hoch. Diese Tatsache mag für die Fehlergebnisse in der KBR verantwortlich sein (Pseudoantigen nach TAKENOMATA, 1924).

Die falschen positiven Ergebnisse in der KBR und in der Präzipitation haben hier die gleiche Ursache wie in der I. Versuchsreihe. Im Vordergrund steht allerdings die Wirkung von "Pseudoantigenen" in Form der Bakteriensubstanzen in der KBR. Daneben dürfte der hohe Haemoglobingehalt des Antigens schuld an vielen Fehldiagnosen in der KBR und Präzipitation sein (die meisten Tiere sind durch Zertrümmerung des Schädels getötet worden, wodurch es auch im Gehirn zu zahlreichen per rhexin-Blutungen gekommen ist).

Schlußbetrachtung

Mit Hilfe der serologischen Untersuchungsmethoden gelingt es, 11 Tollwutfälle zu erfassen, in denen eine pathologisch-histologische Untersuchung des Ammonshornes entweder nicht möglich ist, zweifelhaft erscheint oder negativ ausfällt. Die Präzipitation im Agarmilieu liefert im Vergleich zur KBR etwas bessere Resultate. Aber auch aus technischen Gründen ist ihr der Vorzug zu geben. Sie ist einfach anzusetzen und kann schnell, oft schon nach 18 Stunden, abgelesen werden. Die umständliche Herstellung des komplementbindenden Antigens aus Gehirnmaterial sowie die zeitraubende und diffizile Durchführung der KBR entfallen und zweifellos wird dadurch auch die Gefahr einer Laborinfektion weitgehend herabgesetzt. Als Schnelldiagnostikum ist die Präzipitation im Agar-Gel zwar niemals allein, jedoch als unterstützende Hilfsmethode insbesondere dann zu empfehlen, wenn bei negativem histologischen Befund im Rahmen von Massenuntersuchungen ein Anhaltspunkt für den Einsatz des Tierversuches gesucht wird.

Zusammenfassung

1. In zwei Versuchsreihen wird die KBR und die Präzipitation im Agarmilieu in parallel laufenden Untersuchungen durchgeführt.

2. In der I. Versuchsreihe werden 450 Gehirne von Haus- und Wildtieren in der KBR und in der Präzipitation untersucht. Zur Kontrolle dient in 434 Fällen die pathologisch-histologische Untersuchung des Ammonshornes und in 105 Fällen der Tierversuch.

3. Es wird festgestellt, daß beide serologische Untersuchungsmethoden nicht immer übereinstimmen. 32 mal liefert die KBR und 35 mal die Präzipitation im Agar-Gel allein ein positives Ergebnis, das 26 mal in der KBR und 25 mal in der Präzipitation nicht mit den Kontrollen übereinstimmt und als falsch gewertet wird.

4. In 13 Fällen, in denen mittels der klassischen Untersuchungsmethoden das Vorliegen von Tollwut festgestellt wurde, ist die Präzipitation negativ. Die KBR ist 18 mal beim Nachweis von Negri-

körperchen oder bei positiven Ausgang des Tierversuches negativ.

5. Mit Hilfe der serologischen Untersuchungsmethoden gelingt es 11 Tollwutfälle zu erfassen in denen die histologische Untersuchung nicht möglich ist, zweifelhaft erscheint oder negativ ausfällt, der Tierversuch jedoch ebenfalls positiv ist.

6. Auf Grund der etwas besseren Ergebnisse und der einfacheren Vorbehandlung des Gehirnmaterials ist die Präzipitation der KBR vorzuziehen.

7. In der II. Versuchsreihe werden 762 Gehirne von Wildtieren aus einem Tollwutgebiet mit Hilfe der Präzipitation im Agar-Gel und der KBR untersucht.

8. Das in der TKBA entnommene Gehirnmaterial ist als Antigen für die KBR nicht verwendbar. Durch "Pseudoantigene", - in diesem Fall wohl Zersetzungsprodukte des Gehirns und Bakteriensubstanzen - gibt es bei 641 Untersuchungen 227 positive Ergebnisse. Der Rest liefert negative Resultate. Die Präzipitation ist in 21 Fällen positiv. Im Tierversuch gelingt es 3 mal das Virus der Tollwut aus den Gehirnen zu isolieren, die in der Präzipitation positiv sind.

9. Die im Untersuchungsamt entnommenen Gehirne der II. Versuchsreihe sind 4 mal in der KBR und 6 mal in der Präzipitation positiv. Einmal stimmen beide serologische Untersuchungsmethoden überein. In diesem Fall gelingt auch der Virusnachweis.

Literaturverzeichnis

ADUTZKEWITSCH, B.A. (1951): Eine neue Methode zur Diagnose der Tollwut bei toten Haustieren. Veterinarija 11 32 (russisch)

AGUZZI, A. (1900): zit. nach VÖHRINGER (1955)

AKSEL, J.S. und AYKAN, T.B. (1957): Le comportement en culture du tissue cérébral infecté par le virus rabique. L'évulution des corpuscules de Negri in vitro dans le tissue cérébral rabique. Ann. Inst. Pasteur, Paris 93 30

AMITROW, W.K. (1956): Füchse als Überträger der Tollwut. Veterinarija 33 33 (russisch)

ANDO, K., ISHII, K., IRIZAWA, I., SHIMADA, K., KATO, T. und MURAHAMI, H. (1953): Studies on the immunological diagnosis of the animals suspected of rabies. Jap. J. Med. Sci. Biol. 6 659

ANONYM (1949): Rabies virus in blood. ref. in J. Am. Vet. Med. Ass. 114 289

ATTILLI, L. (1956): Sul valore die alcuni recenti metodi di laboratorio per la diagnosi della rabbia. Boll. Inst. Sierot. Milanese 35 504 ref. in Zbl. Bakt. Abt. I Ref. 166 532 1958

BALLA, E. (1911): zit. nach PAARMANN (1955)

BARONI, V., CIUCA, M., und JONESCU-MIHAIESTI (1908): Recherches sur d'anticorps specifiques dans le serum et les extraits d'organes d'animaux vaccines contre la rage. Compt. Rend. Soc. Biol. 65 96

BARTEL, H. (1947): Zur Diagnose der Tollwut. Zbl. Bakt. Abt. I Orig. 152 8

BELL, J. LE, BOER, C.J. DE, HAZZ, E.K. und COX, H.R. (1950): Complement-fixing and neutralizing antibody studies on humans vaccinated against rabies. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 73 225

BENAZZI, P. und MANTOVANI, A. (1953): Richerche sulla formazione e persistenza degli anticorpi neutralizanti e fissanti il complemento in cani vaccinati contro la rabbia.
At. Soc. It. Sci. Vet. 7 840

BERGER (1911): zit. nach PAARMANN (1955)

BEQUIGNON, R., GUICHARD, A. und VIALAT, C. (1953): Apparition de corps de Negri dans les lésions provoquées par la virus fixe (souche Louis Pasteur) sous l'action de la Hyaluronidase.
Ann. Inst. Pasteur, Paris 85 263

BERNKOPF, H. und NACHTIGAL, D. (1943): Complement-fixation with sera of animals immunized with rabies virus.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med 53 36

BERRY, J.L. und MANN, A. (1910): The complement-binding test in rabies.
J. Exper. Med. 12 338

BERTARELLI, E. (1913): zit. nach KOLLE und WASSERMANN Handbuch der pathogenen Mikroorganismen.

BINDRICH, H. und KUWERT, E. (1957): Zur Diagnose der Tollwut (vorläufige Mitteilung).
Mhefte Vet. Med. 12 380

BINDRICH, H. und KUWERT, E. (1957): Die diagnostische Bedeutung der Komplementbindungsreaktion bei Tollwut.
Arch. exper. Vet. Med. 11 1015

BINDRICH, H., KUWERT, E. und BECKER (1959): Zur Frage der latenten Tollwutinfektion bei Wildtieren.
Arch. exper. Vet. Med. 13 579

BINDRICH, H., POTEL, K. und KUWERT, E. (1958): Vergleichende Untersuchungen über den Gehalt an komplementbindendem Antigen und gewebliche Veränderungen im Gehirn tollwutkranker Hunde nach experimenteller Infektion.
Arch. exper. Vet. Med. 12 134

BODEON, L. (1955): zit. nach VILLEMOT und PROVOST (1958)

BOER, J. DE, und COX, H.R. (1947): Specific complement-fixing diagnostic antigens for neurotropic viral diseases.
J. Immun. 55 193

BRANDENBURG, H. (1952): Zur Lyssadiagnostik.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 65 147

BRANDENBURG, H. (1952/53): Zum diagnostischen Tierversuch auf Tollwut.
Zbl. Bakt. Abt. I Orig. 159 23

BROOKS, A.G. (1950): Studies on rabies IV. Some personal observations.
Ind. J. Med. Res. 38 493

BROSCH, J. (1926/27): Über das Verhalten der Muriden nach Lyssainfektion unter besonderer Berücksichtigung der Brauchbarkeit dieser Tierart für den diagnostischen Tierversuch.
Zbl. Bakt. Abt. I Orig. 105 192

BROWN und CRICK (1958): zit. nach VILLEMOT und PROVOST (1958)

BULLING (1955): Die Züchtung des Tollwutvirus im Hühnerei.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 68 238

BULLING, E. (1957): Die Komplementbindungsreaktion als Hilfsmittel für die Tollwutdiagnostik.
Zbl. Bakt. I Orig. 169 161

BURMEISTER, W.H. (1915): The absence of demonstrable specific antibodies in rabies caused by fixed virus.
J. Infect. Dis. 17 423

BURTIN, P. (1956): zit. nach FEINBERG (1958)

CAPPONI, M. und SUREAU, P. (1955): Une épizootie de rage canine àDalat.
Bull. Soc. Path. Exot. 48 616

CARMICHAEL, L.E. und SARKAR, S. (1958): An indirect hemagglutination test for detecting infectious canine hepatitis virus antibodies.
Corn. Vet 48 4

CASALS, J. und PALACIOS, R. (1941): Complement-fixation in encephalitis and rabies virus infections.
Science 93 162

CASALS, J. und PALACIOS, R. (1941): The complement-fixation test in the diagnosis of virus infextions of the central nervous system.
J. Exper. Med. 74 409

CASALS, J. (1949): Acetone-ether extracted antigens for complement-fixation with certain neurotropic viruses.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 70 339

CENTANNI, E. (1908): Die Diagnose der Tollwut mit Hilfe der Komplementdingungsreaktion.
Zbl. Bakt. I Orig. 41 706

CHABAUD, M.A., SERIE, C.und ANDRAE, L. (1955): Electrophorese et diagnostique de la rage.
Ann. Inst. Pasteur, Paris 88 420

COLES, A.C. (1937): Intraendothelial bodies in the vessels of the brain and spinal cord in rabies.
J. Path. 44 315

COLLIER (1940): Beitrag zur Kenntnis der Tollwut (stille Wut) des Hundes.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 53 492

DAWSON, J.R. (1939): Infection of chickens and chickembryos with rabies.
Science 89 300

DEPOUC, R. und MERVEILLE, P. (1954): Sur la valeur de la reaction de deviation du complement dans le diagnostic de la rage.
Ann. Inst. Pasteur, Paris 90 182

DEPOUX, R. und J. ORIO (1958): Deuxième note sur la reaction de fixation du complement dans le diagnostic de la rage.
Bull. Soc. Path. Exot. 51 157

DOBROWOLSKAJA, N.A. (1910): Zur Frage der Komplementbindungsreaktion bei Lyssa.
Zbl. Bakt. I Orig. 56 177

DONATI, A. und SATTA, G. (1908): Sulla deviazione del complemento nella rabbia.
ref. in Zbl. Bakt. I Ref. 45 596 1910

DUFFY, C.E., WOLLY, P.V. und NOTLING, W.S. (1947): Rabies (A case report with notes on the isolation of the virus form saliva).

J. Pediat. 31 Oktober 1947 440
ref. in J. Am. Vet. Med. Ass. 114 320 1948

EDLINGER (1957/58): Diskussionsbemerkung zur GILLERT und HERRMANN: Zur Anwendung der Elektrophorese bei der qualitativen Bewertung von Immunseren (Antiglobulinseren)
Zbl. Bakt. I Orig. 170 348

EMANUILOFF, J. (1941): Plexusepitheleinschlüsse und die Tollwutdiagnose beim Pferd.
Zschr. Infekt. Haust. 58 105

ENDE, M. VAN DEN, POLSON, A. und TURNER, G.S. (1957): Experiments with the soluble antigen of rabies in suckling mouse brains.
J. Hyg. 55 361

ERCEGOVAC, D. und TURUBATOVIC, R. (1954): Le diagnostic de la rage basé sur l'apparation prématureé des corpuscules de Negri.
Off. Intern Epizoot. 42 115

ERNST, W. (1926): Tollwutuntersuchungen.
Münch. tierärztl. Wschr. 77 33

ESPANA, C. und HAMMON, W.D. (1947): An improved benzene-extracted complement fixing antigen for certain neurotropic viruses.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 66 101

ETCHEBARNE, M.P., BERNAL, P.G. und LAYTON, G.R. (1960): Purification of rabies virus; importance of the fluorescent antibody technique.
J. Immun. 84 6
ref. in Biol. Abstr. Sect. C 35 (14) 1960 unter 38682

FALKE, D. (1960): Versuche zur Reinigung von S-Antigenen des Tollwutvirus.
Mhefte prakt. Tierhk. 12 181

FALKE, D. und UHLMANN, W. (1957): Zur Frage der serologischen Tollwutdiagnose mit Hilfe des Komplementbindungstestes.
Mhefte prakt. Tierhk. 9 243

FANKHAUSER, R. (1955): Neuropathologische Befunde bei Wildtieren.
Schw. Arch. Tierhk. 97 53

FEINBERG, R. (1958): Studies on non-precipitating antibody coexiting with precipitating antibody.
J. Immun. 81 14

FELDFORTH (1955): zit. nach PAARMANN (1955)

FERMI, C. (1950): La Rabbia
Sclavo - Sienna 2 Bände

FIELD, E.J. (1954): Pathogenesis of rabies following corneal inoculation in the rabbit.
J. Path. Bact. 68 335

FLIR, K. (1953): Ausstrichverfahren nach Sellers in der Tollwutdiagnostik.
Mhefte Vet. med. 8 524

FRAS, A. und GRMOVSEK, P. (1958): Dijagnostika bjesnoke pomocu Gel-difuzionog precipitin testa.
Vet. Arhiv 28 253

FRIEDBERGER, E. (1907): Hat die Methode der Komplementablenkung eine Bedeutung für die Diagnose der Lyssa?
Wien. klin. Wschr. 20 879

FRIEDMAN, M. und BENNET, C.R. (1957): A hemagglutination test for detecting of adenovirus antibodies.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 94 712

GALLIA, F. (1946): Immunologische Differenzierungen zwischen dem Virus fixe-Stamm Pasteur und dem paralytischen Tollwutstamm Venezuela.
Can. J. Comp. Med. 10 223 (englisch)

GALTIER, TRAVALI und RATZ: zit. nach KRAUS, GERLACH und SCHWEINBURG (1926)

GILDEMEISTER, E., HAAGEN, E. und WALDMANN, O. (1939): Handbuch der Viruskrankheiten.
Band 2 Gustav Fischer Verlag Jena

GISPEN, R. (1955): zit. nach WILSON und PRINGLE (1954)

GLUSMANN, M. und SOLOWJOWA, J. (1927): Über den diagnostischen Wert der Komplementbindungsreaktion bei Lyssa.
Ztschr. Immun. exper. Ther. 54 199

GOLDWASSER, R.A. und KISSLING, R.E. (1958): Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigen.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 98 219

GORSHUNOWA, L.P. (1958): Das Problem der asymptomatischen Form der Tollwut.
Woprossü Virosol. 3 116 (russisch)

GREVAL, S.D. (1933): On rabies. Complement-fixation in rabies, the technique, its purpose and associated considerations.
Ind. J. Med. Resc. 20 913
ref. in Zbl. Bakt. I Ref. 110 345

GRIEM, W. (1953): Die Verwendung der weißen Maus zur Tollwutdiagnose.
Mhefte Vet. med. 8 267

GUNDELACH (1923): zit. nach PAARMANN (1955)

HABERMANN, R.T., HERMAN, C.M. und WILLIAMS, F.D. (1958): Distemper in racoons and foxes suspected of having rabies.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 132 31

HALLAUER, C. (1946): Über den Virusnachweis mit dem Hirst-Test.
Schwz. Ztschr. Path. 9 553

HALLAUER, C. (1950): zit. nach DOERR und HALLAUER, Handbuch der Virusforschung.
2. Ergänzungsband.
Springer Verlag Wien

HARMS, F. und HOBIGK, W. (1953): Zur Tollwutdiagnostik.
Mhefte Vet. med. 8 310

HEBEL, G. (1960): Zur Diagnose und Differentialdiagnose der Tollwut.
Vet. Med. Diss. Berlin (FU)

HELLER, O.und TOMARKIN, E. (1907): Ist die Methode der Komplementbindung zum Nachweis spezifischer Stoffe bei Hundswut und Vaccine brauchbar?
Dtsch. med. Wschr. 33 795

HELMBOLDT, C.F. und JUNGHERR, E.L. (1955): Distemper complex in wild carnivores simulating rabies.
Am. J. Vet. Res. 16 463

HERZOG, E. (1942): Eine zuverlässige Methode zur schnellen Diagnose der Tollwut.
Klin. Wschr. 749

HINTON (1952): zit. nach LAPI, DAVIS und WAYNE (1952)

HIRST, G.K. (1942): zit. nach NANI (1951)

HOROWITZ-WLASSOWA, L. (1926): Über die Komplementablenkungsreaktion bei der Tollwut.
Zbl. Bakt. I Orig. 98 216

HOTTA, T. (1928): Zur Diagnose der Tollwut mittels Komplementablenkung.
Wien. klin. Wschr. 44 1513

HUTYRA, F.v., MAREK, J., MANNINGER, R. und MOCSY, J.(1959): Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere.
VEB Fischer Verlag Jena

IMIG, F. (1928): Die Verwertbarkeit der Komplementbindungsreaktion zur Diagnose der Borna'schen Krankheit und der Tollwut.
Vet. Med. Diss. Giessen

JENSEN, K.E. und FRANCIS, T. (1953): Antigen-antibody precipitates in solid medium with influenca virus.
J. Immun. 70 321

JONESCU, D. (1943): Untersuchungen über die Autolyse von Tollwutgehirnen.
Zbl. Bakt. I Orig. 151 21

KANTOROWITSCH, R.A. (1956): Ätiologie des Verwilderns der Tiere im Polargebiet. II. Mitteilung. Pathomorphologie des Zentralnervensystems bei experimentellem Verwildern.
Woprossü Virosol. 5 33 (russisch)

KAPLAN, M. (1954): Les progrès récent dans la lutte contre la rage chez les animaux.
Off. Intern. Epizoot. 188

KAUKER, E. (1961): Beitrag zur Frage der Tollwutheilung.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 68 258

KIPPS, A.D., DU, T., NAUDE, W., POLSON, A., SELZER, G.und ENDE, M. VAN DEN (1957): The size distribution of spezific antigens in virus infected tissues and their significance.
Ciba Found. Symp. Nat. Vir. 224

KIRK, R.C. und ECKER, E.E. (1949): Time of appearance of antibodies to brain in the human receiving antirabies vaccine.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 70 734

KISSLING, R. E. (1958): Growth of rabies virus in non nervous tissue culture.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 98 223
ref. in Zbl. Bakt. I Ref. 170 542 1959

KOLMER, J. A. und TRIST, M. (1916): Non specific complement-fixation with normal rabbit serum.
J. Infect. Dis. 18 20

KONDO, S. und OBANDA, K. (1929): Studies of the complement-fixation reaction in rabies.
J. Jap. Soc. Vet. Sci. 252
ref. in Zbl. Bakt. I Ref. 98 341 1930

KORNILOWA, A. L. und KURANOW J. F. (1955): Das Auffinden Negri'scher Körperchen im Ausstrich bei der Diagnostik der Tollwut.
Veterinarija 84 (russisch)

KOSTREZEWSKI, J. (1920): Untersuchungen über die Blutserumeigenschaften bei den tollwutschutzgeimpften Menschen.
Zbl. Bakt. I Orig. 84 106

KOZEWALOFF, S. (1910): Über komplementbindende und rabizide Substanzen im Blute wutkranker Kaninchen.
Zbl. Bakt. I Orig.

KRAUS, R., GERLACH, F. und SCHWEINBURG, F. (1926): Lyssa bei Mensch und Tier.
Urban und Schwarzenberg Berlin-Wien

KRAUS, R. und MICHALKA, J. (1926): Komplementbindung als diagnostisches Hilfsmittel bei Lyssa.
Zbl. Bakt. I Ref. 83 333

KRAUS, R. und MICHALKA, J. (1926): Die Diagnose des Lyssavirus mittels Komplementablenkung mit Koktoimmunogen und Glyzerinext rakt. II. Mitteilung.
Zschr. Immunitätsf. 47 504

KRAUS, R. und TAKAKI, J. (1926): Der Nachweis der neurotropen Virusarten mittels Komplementablenkung mit Koktoantigenen.
Wien. klin. Wschr. 39 624

KUWERT, E. (1960): Komplementbindendes und infektiöses Antigen beim Tollwutvirus.
Arch. exper. Vet. med. 14 1049

KUWERT, E. und LIEBENOW, W. (1959): Die Stabilität des Tollwutvirus bei verschiedenen H-Jonenkonzentrationen, verschiedenen Temperaturen und Formaldehydeinwirkung.
Arch. exper. Vet. med. 13 335

KUWERT, E. und OLECHNOWITZ, A. F. (1960): Vergleichende serologische und elektrophoretische Untersuchungen an rabiziden Hundehyperimmunseren.
Arch. exper. Vet. med. 14 191

LAMB, G. und KENDRICK, A.G. (1910): Beobachtungen über Tollwut mit besonderer Beziehung auf eine atrophische Form der Krankheit bei Tieren.
Berl. tierärztl. Wschr. 156

LANG und SCHWICK (1955): Diskussionsbemerkung bei GRABAR: Untersuchungen von Serum-Eiweissstoffen mit Hilfe immunochemischer Methoden.
Zbl. Bakt. I Orig. 164 15

LAPI, A., DAVIS, C.L. und WAYNE, A.A. (1952): The Gasserian ganglion in animals dead of rabies.
J. Am. Vet. Med. Ass. 120 379

LÄSSER (1927): Die Diagnose der Tollwut durch Präzipitation.
Zschr. Immun. exper. Ther. 53 1

LEACH, C.N. (1938): Comparative methods of diagnosis of rabies in animals.
Am. J. Publ. Health 28 162

LEPINE, P. (1954): zit. nach KAPLAN (1954)

LEVADITI, C. und SCHOEN, R. (1936): Virus rabique et cellules neoplastique.
C. r. Acad. Sci. 202 702

LEVADITI, C. und SCHOEN, R. (1936): Negrinese et regenerescence epitheliale.
C. r. Soc. Biol. 121 716

LEVINSON, S.O., MILZER, H.J., SHANGHNESSY, I.L. und OPPENHEIMER, N.F. (1944): Production of potent inactivated vaccines with ultraviolet inactivation II. An abbreviated preliminary report on sterilisation of bacterian and immunisation with rabies and St. Louis Encephalitis virus.
Am. Med. Assoc. 125 531

LINDNER, H. (1960): Der Nachweis von Negri'schen Körperchen mit der Färbung nach Muromzew. Mhefte Vet. med. 15 557

LINSERT, H. TEMPLIN, G. und WOLTER, R. (1959): Die Komplementbindungsreaktion als Diagnostikum bei Routineuntersuchungen auf Tollwut. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 72 323

LIPTON, M.M. und FREUND, J. (1950): The formation of complement-fixing and neutralizing antibodies after the injection of inactivated rabies virus with adjuvans. J. Immun. 64 297

MACE, D.L. und CORTEZ, F.S. (1949): Immunity status of normal, vaccinated and rabid animals. J. Am. Vet. Med. Ass. 115 24

MANOUELIN, Y. (1935): Neurones virulentes et infection de la salive au cours de la rage. C.r. Soc. Biol. 119 256

MANSI, W. (1957): The study of some viruses by plate gel diffusion precipitation test. J. Comp. Path. Ther. 67 297

MARIE, A.C. und URBAIN, A. (1929): La reaction de fixation dans la rage. C. r. Soc. Biol. 101 561

MARSHALL, J.D., EVELAND, W.C. und SMITH, C.W. (1958): Superiority of fluorescein-isothiocyanate (Riggs) for fluorescent-antibody-technic with a modification of its application. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 98 898

MARTIN, R.L. (1959): A history of chiropteran rabies with special reference to occurence and importance in the United States. Abstr. Wildl. Dis. No. 3

MATHIAS, D. und LINDNER, H. (1960): Die Tollwutdiagnose mit Hilfe des Ausstrichverfahrens nach Muromzew. Mhefte Vet. med. Sonderheft II 40

MAZZEI (1926): zit. nach KRAUS, GERLACH und SCHWEINBURG (1926)

MCCHELLAND, R.B. und HARE, R. (1941): zit. nach NANI (1951)

MCQUEEN, J. L. (1959): Rabies diagnosis. Special application of fluorescent antibody techniques.
Proc. 63rd Meet. US Livestock Sanit. Ass. San Francisco 356

MECINSKA, J. (1954): Proby nad odczynem wiazania dopolniacza i hemaglutinacje przy wscieklznie.
Ann. Univ. Lublin Sect. D. D. 7 169

MICHALKA, J. (1927): Beitrag zur Diagnose der filtrierbaren Virusarten mittels Komplementbindungsreaktion.
Zschr. Immunitätsf. 48 227

MICHALKA, J. (1942): Tollwut beim Schwein. Beitrag zur Differentialdiagnose der ansteckenden Schweinelähmung.
Wien. tierärztl. Mschr. 29 12

MOHR, W. und ENIGK, K. (1952): Tollwut (Lyssa oder Rabies) in Handbuch der inneren Medizin, Bergmann, Frey und Schick I/1 Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg

MONOD (1900): zit. nach VÖHRINGER (1955)

MOORE (1909): zit. nach PAARMANN (1955)

MOSES, A. (1909): Über den Nachweis von Antigen und Antikörpern durch Komplementablenkung.
Memor. do Inst. Oswaldo Cruz T. I. II ref. in Zbl. Bakt. I Ref. 47 505 1910

NANI, S. (1951): Indagini sui fenomeni di emoagglutinazione e di adsorbimento nel virus fisso della rabbia.
Arch. Vet. Ital. II/4

NAGLE, N. (1937): A modification of van Giesons stain for Negri bodies.
Am. J. Publ. Health 27 356

NEDRIGAILOFF, W. und SAWTSCHENKO, W. (1911): Über die Anwendung der Komplementbindungsmethode für die Diagnose der Tollwut.
Zschr. Immunitätsf. 8 353

NEGRI, A. (1903): Zur Ätiologie der Tollwut. Die Diagnose der Tollwut auf Grund der neuen Befunde.
Zschr. Hyg. 44 519

NIEBERLE, K. und COHRS, P. (1954): Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. VEB Fischer Verlag Jena 4. Auflage.

NIKOLITSCH, M. (1957): Viruskonzentration und Inkubationslänge. Arch. Hyg. Bakt. 141 361

NIKOLITSCH, M., GILDEMEISTER, H. und JELESITSCH, Z. (1959): Die Vermehrung des Tollwutvirus in einem für die Tollwut nicht empfänglichen Tierorganismus. Arch. Hyg. Bakt. 143 357

NÖRR, J. (1935): Über tollwutverdächtige Erscheinungen bei der sogenannten nervösen Staupe des Hundes. Münch. tierärztl. Wschr. 86 529

NOUVY, M. und CHEVRIER, L. (1958): Sur la diagnostic experimental de la rage. Bull. Soc. Path. Exot. 51 477

OHDER, H. (1954): Ein Beitrag zur Lyssadiagnose. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 67 85

OHDER, H. (1958): Die Labordiagnose der Tollwut. Mhefte Vet. med. 13 483

OHDER, H. (1959): Über die Häufigkeit von Negrikörperchen in verschiedenen Gehirnteilen. Mhefte prakt. Tierhk. 11 123

OLECHNOWITZ, A. F. und KUWERT, E. (1960): Zur Lokalisation der Antikörper in den Proteinfraktionen des rabiziden Hundehyperimmunserums. Arch. exper. Vet. Med. 14 1073

OSHIMA, Y. K., TAKEHARA, K. und TAGAMATSU, Y. (1957): Über die Empfänglichkeit von Goldhamstern für das Rabies-Straßenvirus. Bull. Azabu Vet. Coll. 4 143 (englisch)

OUCHTERLONY, Ö. (1948): zit. nach MANSI (1957)

OUDIN, J. (1946): zit. nach MANSI (1957)

PAARMANN, E. (1954): Die Färbung Negri'scher Körperchen mit Rhodamin B. Zbl. Bakt. I Orig. 161 546

PAARMANN, E. (1955): Tollwutstudien. Tierärztl. Umschau 10 153

PAARMANN, E. (1955): Tollwutuntersuchungen. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 68 122

PALLASKE, G. (1960): Pathologische Histologie. VEB Fischer Verlag Jena

PEARSON, H.E., ATANASIU, P. und LEPINE, P. (1958): La multiplication du virus rabique dans une astrozytome transmissible chez la souris. Ann. Inst. Pasteur, Paris 94 1

PIRINGER, W. (1939): Tollwut. Wien. klin. Wschr. 433

PITSCHKE, H. (1958): Erfahrungen mit dem Sellers-Quetschpräparat und dem Mäuse-Tierversuch bei der Laboratoriumsdiagnose der Tollwut. Zbl. Bakt. I Orig. 172 197

POETSCHKE, G. (1960): Fluorescenz-Immunologie. Zeiss Werkzeitschrift 35 317

POLSON, A. und WESSELS, P. (1953): Particle size of soluble antigen of rabies virus. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 84 317

REAGAN, R.L., YANCEY, F.S., CHAN, S.C. und BRUECKNER, A.L. (1956): Rabies street virus in the Syrian hamster. Am. J. Vet. Res. 17 793

REMLINGER, P. (1926): zit. nach KRAUS, GERLACH und SCHWEINBURG (1926)

REMLINGER, P. und BAILLY, J. (1940): La souris peut-elle remplacer la lapin dans l'étude experimentale de la rage. Arch. Inst. Pasteur, Algerie 18 360

REPETTO (1903): zit. nach PAARMANN (1955)

RHODES, A.J. und ROOYEN, C.E. (1949): Rabies. In Textbook of Virology Nelson u.Sons New York

RICE, C.E. (1960): The use of complement fixation test in the study and diagnosis of viral diseases in man and animals. Can. J. Comp. Med. 24 1

RIGGS, J.L., SEIWALD, R.J., BURKHALTER, J.H., DOWNS, C.M. und METCALF, T.G. (1957): Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immunserum. Am. J. Path. 34 1081

RIVERS, T.M. (1948): Rabies in viral and rickettsial infections of man. Lippincitt Company New York.

ROEMMELE, O. (1954): Abnorme Gehörnbildung bei Rehböcken und akute Bleivergiftung bei Rindern, ein Beitrag zur Differentialdiagnose der Tollwut. Dtsch. tierärztl. Wschr. 61 58

SADLER, W.W. und ENRIGHT, J.B. (1959): Effect of metabolic level of the host upon the pathogenesis of rabies in the bat. J. Infect. Dis. 105 267

SARTORIUS, F. und WINKLER, C. (1959): Observations and research in obtaining of antirabies immunsera, their potency evaluation and way of application. Proc. Internat. Symp. Immun. 369

SCHAAF, J. (1941): Über die Feststellung der Tollwut durch Laboratoriumsmethoden. Tierärztl. Rundschau 47 607

SCHAAF, J., WEIDLICH, N. und STURM, G. (1956): Beitrag zur Diagnose und Differentialdiagnose der Tollwut. Mhefte prakt. Tierhk. 8 108

SCHELLNER, H., HÄRTL, J. und OSTHOFF, P. (1954): Die Tollwut in Bayern in den Jahren 1951 - 1954. Mhefte prakt. Tierhk. 6 241

SCHIFFMANN, J. (1906): zit. nach PAARMANN (1955)

SCHINDLER, R. (1957): Die Komplementbindung als Hilfsmittel für die Differentialdiagnose der Viruskrankheiten des Hundes Mhefte prakt. Tierhk. 9 315

SCHINDLER, R. und DANNIG, H.K. (1958): Untersuchungen über die Bedeutung der Fledermaus für den gegenwärtigen Tollwutseuchenzug in Deutschland. Mhefte prakt. Tierhk. 10 169

SCHLEGEL, M. (1926): Zur Kenntnis der Tollwut. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 42 329

SCHLEIFSTEIN, J. (1937): A rapid method for demonstrating Negri bodies in tissue sections. Am. J. Publ. Health 27 1283

SCHNELLE, W. (1961): Das verschiedenartige klinische Bild der Tollwut beim Rind. Dtsch. tierärztl. Wschr. 68 136

SCHOOP, G. (1953): Tollwut.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 66 284

SCHRÖTER (1954): Veterinärmedizinische Sektion der medizinisch-wissenschaftlichen Gesellschaft für theoretische Medizin und Grenzgebiete in Halle/S. VII. Sitzung am 9. März 1954
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 67 147

SCHULTZ, E.W., BULLOCK, L.T. und BREWER, H. (1928): Studies on the antigenic properties of the ultraviruses. III. The antigenic property of rabies virus.
J. Immun. 15 265

SCHULZE, W. (1953): Die Tollwut als Zoonose, ihre Diagnose und Bekämpfung beim Tier.
Mhefte Vet. med. 8 407

SCHWEINBURG, W. (1932): Über den Nachweis von Lyssavirus in verschiedenen Organen.
Zbl. Bakt. I Orig. 123 434

SELLERS, T.F. (1959): Principles in International medicine, 2nd ed. McGraw-Hill, New York
ref. in Advances in Vet. Sci. 5
Acad. Press Inc., Publishers, New York

SHARMA, P.R. (1958): A simple methode to diagnose rabies by double diffusion test.
J. Vet. Husb. Res. 3 35

SJOLTE, I.P. (1947): Om cytoplastike og nucleare inclusioners forekomst ved spontant forekommende hundesyge.
Skand. Vet. -tskr 37 350

SPROCKHOFF, H. (1955): Untersuchungen über das komplementbindende Antigen in Gehirnen Borna-Virus infizierter Kaninchen. II. Zeitliches Auftreten und Verhalten gegen höhere Temperaturen.
Zbl. Vet. Med. 2 231

SPROCKHOFF, H. und NITSCHKE, E. (1955): Untersuchungen über das komplementbindende Antigen in Gehirnen Borna-Virus infizierter Kaninchen. I. Nachweis eines löslichen Antigens.
Zbl. Vet. Med. 2 185

STARKE, G. und SEIDL, H. (1958): Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Haemagglutination des Tollwutvirus.
Zschr. Hyg. 4 118

STARR, L.E. (1954): Tollwut bei einem Welpen.
Vet. Med. 49 40 (englisch)

STARR, L.E., SELLERS, T.F. und SUNKERS, E.J. (1952): Apparent recovery of a dog from rabies. J. Am. Vet. Med. Ass. 121 296

STEELE, J.H. und THIERKEL, E.S. (1949): Rabies problem and control. A national wide problem.
Publ. Health Rep. 785

SVET-MOLDAVSKAJA, J.A. (1958): Experimental study of the infectivity of salivary glands of laboratory animals in the latent form of street rabies.
Acta Virol. English ed. 2 228

SZLACHTA, H.E. und HABEL, R.E. (1953): Inclusions resembling Negribodies in the brain of non rabit cats.
Cornell Vet. 43 207

TAGUCHI, K., MOTO, B., TAKEHARA und URIN, I. (1957): On the complement fixation test of animals suspected of rabies.
J. Jap. Bakt. 12 866

TAKAKI, I., BONIS, A. und KOREF, O. (1926): Die Komplementablenkung mittels Koktoantigene als Methode zur Identifizierung und Differenzierung des filtrierbaren Virus.
Zschr. Immun. 47 431

TAKAKI, I. (1926): Über das Virus der Enzephalitis japonica.
Zschr. Immun. 47 441

TAKENOMATA, N. (1924): Über nichtspezifische Komplementbindungserscheinungen und ihre Abhängigkeit von der Kolloidlabilität des Blutserums.
Zschr. Immun. 41 508

TANG, F.F. und CASTANEDA, M.R. (1929): Complement fixation reaction with rabies and herpes Viruses.
J. Immun. 14 151

THOMPSON, S.W. (1957): The effect of 5 proteolytic enzymes on some antigenic characteristics of rabies virus with observation on

the resistance of the virus to heat.
Am. J. Vet. Res. 18 886

THOMPSON, S.W. (1957): Comparison of some routine laboratory procedures for diagnosis rabies.
Military Med. 121 388

TREFLINGER, L. (1949): Über die Lyssa bei Fuchs, Dachs und Reh.
Wien. tierärztl. Mschr. 36 57

TRUBINA, L.M. (1957): Zur Frage der Serodiagnostik bei Tollwut.
Woprossü Virosol. 161 (russisch)

UEHLKE, H. (1958): Neue Möglichkeiten zur Herstellung fluorescenzmarkierter Proteine.
Zschr. Naturfg. B 722

UEKI, H., KATO, T., OISHI, J., MURAHAMI, H. und SHIMADA, K. (1957): Oberservations of the time of appearance of Negri-bodies, complement fixing antigens and virulence in mouse brains inoculated with rabies street virus.
Am. J. Vet. Res. 18 216

UHLMANN, W. und FALKE, D. (1957): Die Differenzierung der Negrikörperchen im gefärbten Präparat mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskopes.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 70 365

VERARAGHAVAN, N. (1946): zit. nach FERMI (1950)

VILLEMOT, J.M. und PROVOST, A. (1958): Précipitation en milieu gélifié du virus rabique par le sérum rabique hyperimmun.
Rev. d'Elevage Med. Vet. 11 387

VILLEMOT, J.M. (1960): persönliche Mitteilung.

VÖHRINGER, K. (1955): Tollwut bei einem Hunde.
Mhefte Vet. med. 10 320

WACHENDÖRFER, G. (1961): Die Laboratoriumsdiagnose der Tollwut mit Hilfe der Färbemethoden nach Lentz und Paarmann und des Mäuseversuches.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 68 261

WAINBERG, B.G. (1951): Die Labordiagnose der Tollwut mit Hilfe der Agglutination von Bakterien, die Virus adsorbiert haben.
Veterinarija 40 (russisch)

WASCHKUHN, F. (1918): Desinfektionsversuche bei Lyssa. Med. Diss. Jena

WEILAND, H. (1935): Untersuchungen über das Vorkommen eosinophiler Einschlüsse in den Ganglienzellen des Katzengehirnes. Vet. Med. Diss. Leipzig

WEISS, T. (1952): zit. nach PAARMANN (1955)

WILCOX, F.P. und HUBBARD, R.C. (1958): Rabies epizootic in dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Ass. 130 63 ref. in Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 71 35 1958

WILSON, M.W. und PRINGLE, B.H. (1954): Experimental studies of the agar plate precipitin test of Ouchterlony. J. Immun. 73 232

WOERNLE, H. (1959): Diagnose der infektiösen Bronchitis der Hühner mit Hilfe der Präzipitationsreaktion im festen Agarmedium. Mhefte prakt. Tierhk. 11 154

WOERNLE, H. persönliche Mitteilung.

WORLD HEALTH ORGANISATION Technical Report Series
Expert Commitee on Rabies
(1950) Report on the first session 9 28
(1954) Second report 17 82
(1957) Third report 23 121
(1960) Fourth report 5 201
(1954) Laboratory techniques in rabies

YOSHINO, K., KUMA, N., KONDO, A. und KITAOKA, M. (1956): Infektion von Eintage-Hühnereiern mit Tollwutvirus Jap. J. Med. Sci. Biol. 9 259 und 273

ZELL, C.A. (1913): Serodiagnosis of rabies. Am. J. Vet. Med. Ass. 8 637

ZUNKER, M. (1953): Über atypischen Verlauf von experimentellen Tollwutinfektionen. Mhefte prakt. Tierhk. 5 2

Zum Schluß dieser Arbeit sei es mir gestattet, Herrn Ob.-Reg.-Vet.-Rat Dr. Otto Scheu für die Überlassung des Themas und die jederzeit freundlich gewährte Unterstützung herzlichsten Dank zu sagen.

Lebenslauf

Am 10. Juli 1933 wurde ich Manfred, Franz, Karl Peter als Sohn des Postassistenten Rudolf Peter in Neuruppin geboren. Meine Schulzeit begann in der Grundschule von Gransee Ostern 1939. Von 1943 bis 1949 besuchte ich die Gransee'r Hauptschule, die nach dem Zusammenbruch Mittel- und später Oberschule im Aufbau wurde. Bis zum Abitur lernte ich an der Oberschule in Oranienburg zwei Jahre. Meine Bewerbungen zum Studium der Veterinärmedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin wurden 1951 und 1952 abgelehnt. Während dieser beiden Jahre bis zum August 1953 war ich Bauarbeiter. 1953 erhielt ich die Zulassung zum Studium an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin. Hier legte ich 1955 die tierärztliche Vorprüfung ab. Das Staatsexamen habe ich an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität zu Berlin 1959 bestanden. Die Praktikantenzeit habe ich bei Dr. Lützrodt in Ilsfeld Kreis Heilbronn absolviert. Mit Wirkung vom 21. Februar 1960 erhielt ich die Bestallung als Tierarzt. Ein Jahr lang, vom 15. März 1960 bis zum 14. März 1961 war ich Volontärtierarzt am Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamt in Stuttgart.